



Attorney Docket No. 02356.0087
Customer Number 22,852

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Yosser BEN ACHOUR et al.

Application No.: 10/733,232

Filed: December 12, 2003

For: GENES ASSOCIATED WITH
LEISHMANIA PARASITE
VIRULENCE

)
)
) Group Art Unit:
)
) Examiner:
)
)
)
)
)
)

**Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450**

Sir:

CLAIM FOR PRIORITY

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of French Patent Application No. 10/07985, filed June 18, 2001, for the above-identified U.S. patent application.

In support of this claim for priority, enclosed is one certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: August 4, 2004

By: 

Ernest F. Chapman
Reg. No. 25,961

EFC/FPD/gah
Enclosures

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 12 FEV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 12 FEV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JUIN 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0107985 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 18 JUIN 2001		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. 3 rue Chauveau-Lagarde 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B4866-VMa			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	N°
			Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) GENE ASSOCIE A LA VIRULENCE DU PARASITE LEISHMANIA.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT PASTEUR DE TUNIS	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public de santé	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	13 Place Pasteur	
	Code postal et ville	1002	TUNIS -BELVEDERE
Pays		TUNISIE	
Nationalité		Tunisienne	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JUIN 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0107985 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		B4 866 - AD/VMA	
6 MANDATAIRE			
Nom		DESAIX	
Prénom		Anne	
Cabinet ou Société		ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 rue Chauveau-Lagarde	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 44 51 18 00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 42 66 08 90	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		info@egyp.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i> :	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) DESAIX Anne CPI n° 93.3006		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1... / 1...

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JUIN 2001 LIEU 75 INPI PARIS		Réservé à l'INPI	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		0107985	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire			
Vos références pour ce dossier (facultatif)		B4866-VMa	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N°	
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N°	
		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N°	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT PASTEUR	
Prénoms			
Forme juridique		Fondation privée reconnue d'utilité publique	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Adresse	Rue	25-28 rue du Dr. Roux	
	Code postal et ville	75724	PARIS CEDEX 15
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		<input type="text"/>	
N° de télécopie (facultatif)		<input type="text"/>	
Adresse électronique (facultatif)		<input type="text"/>	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Pays			
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)		<input type="text"/>	
N° de télécopie (facultatif)		<input type="text"/>	
Adresse électronique (facultatif)		<input type="text"/>	
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) DESAIX Anne - CPI n° 93-3006		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

GENE ASSOCIE A LA VIRULENCE DU PARASITE LEISHMANIA

L'invention se situe dans le domaine de la lutte contre les leishmanioses. Elle résulte de la mise en évidence, à partir d'isolats sauvages de *Leishmania major*, d'un gène codant pour une protéine, désignée LmPDI, présentant deux régions identiques à la séquence (Cys-Gly-His-Cys) du site actif potentiel des protéines disulfides isomérases (PDI). Cette protéine LmPDI est exprimée de façon prédominante dans les isolats les plus virulents du parasite. Elle constitue d'une part, une nouvelle cible thérapeutique pour élaborer des médicaments anti-leishmaniose et, d'autre part, un élément nouveau pouvant entrer dans la composition de préparations immunogènes et éventuellement vaccinales, destinées à protéger un hôte, humain ou animal, contre *Leishmania*.

Les leishmanioses constituent un groupe hétérogène de pathologies qui affectent plusieurs millions d'individus et sont dues à l'infection de l'hôte par un parasite protozoaire du genre *Leishmania*. L'expression clinique de l'infection est caractérisée par un grand polymorphisme, incluant l'infection asymptomatique, les formes cutanées simples ou récidivantes, les formes cutanées diffuses ou anergiques, les formes cutanéomuqueuses et les formes viscérales, mortelles en l'absence de traitement spécifique. En général, et selon la distribution géographique de la maladie, chaque espèce ou sous-espèce de *Leishmania* est responsable d'une forme clinique particulière; cependant, cette règle n'est pas stricte. De plus, dans un même foyer, une même espèce parasitaire peut être responsable de formes cliniques de sévérité variable. Cette diversité dans l'expression clinique de l'infection est due, au moins en partie, à une diversité dans la virulence du parasite.

Durant son cycle, le parasite alterne entre deux stades : le stade promastigote flagellé, qui se trouve dans le tube digestif de l'insecte

vecteur, et le stade amastigote dans le macrophage de l'hôte. Les drogues anti-leishmaniennes sont difficiles à utiliser, entre autre à cause de leur toxicité et des résistances de plus en plus fréquentes développées par le parasite (Lira, Sundar et al. 1999). Par ailleurs, les vaccins récemment développés et testés n'ont pas montré, pour le moment, l'efficacité attendue (Sharifi, FeKri et al. 1998; Khalil, El Hassan et al. 2000).

L'absence d'outils pour le contrôle des leishmanioses est expliquée en partie par la complexité des cycles de transmission du parasite et par l'insuffisance des connaissances actuelles sur la biologie du parasite. Durant les dix dernières années, plusieurs molécules ayant un rôle fondamental dans la biologie et l'infectivité du parasite ont été identifiées. Des modifications des glyco-conjugués de surface, particulièrement le lipophospho-glycane (LPG), sont associées à des modifications dans l'infectivité et la virulence du parasite *Leishmania (L.) major* et *L. donovani* (Beverley and Turco 1998; Desjardins and Descoteaux 1998; Sacks, Modi et al. 2000; Spath, Epstein et al. 2000), ce qui ne semble pas être le cas pour *L. mexicana* (Ilg 2000; Ilg, Demar et al. 2001). Des molécules impliquées dans la biosynthèse du LPG : phosphomannose isomérase (Garami and Ilg 2001), LPG1 (Sacks, Modi et al. 2000; Spath, Epstein et al. 2000), LPG2 (Descoteaux, Luo et al. 1995) et galactosyl transférase (De and Roy 1999) ont été aussi associées à la virulence de *Leishmania*. D'autres facteurs de virulence ont été récemment décrits. Ils comprennent la famille des cystéine protéinases (Mottram, Brooks et al. 1998), les *mitogen-activated protein* (MAP)-kinases (Wiese 1998), le gène A2 (Zhang and Matlashewski 1997), la glycoprotéine de surface gp63 (Chakrabarty, Mukherjee et al. 1996), la *kinetoplastid membrane protein* (KMP)-11 (Mukhopadhyay, Sen et al. 1998), la superoxyde dismutase (Paramchuk, Ismail et al. 1997), la trypanothione reductase (Dumas, Ouellette et al. 1997), et certains membres des protéines du choc thermique (HSP) (Hubel, Krobitsch et al. 1997).

La caractérisation des facteurs de virulence peut avoir des implications fondamentales pour le développement de nouveaux médicaments ou vaccins contre ces affections. En effet, le ciblage préférentiel d'une protéine impliquée dans la virulence du parasite permet d'éviter l'apparition inutile de résistances chez des souches peu dangereuses, résistances qui peuvent ensuite être transmises à d'autres souches. De plus, une mutation de la protéine de virulence ciblée, entraînant une résistance au médicament, peut dans ce cas entraîner aussi une diminution, voire une perte de la virulence du parasite, et donc un certain effet thérapeutique.

Durant les dernières décennies, plusieurs approches ont été utilisées pour aborder l'étude des facteurs de virulence du parasite *Leishmania*. Ces approches sont fondées sur des études génétiques, comme la complémentation de parasites mutés (Ryan, Garraway et al. 1993; Descoteaux, Luo et al. 1995; Desjardins and Descoteaux 1997; Wiese 1998), l'utilisation de la technique de l'invalidation de gène (Titus, Gueiros-Filho et al. 1995; Mottram, Souza et al. 1996; Dumas, Ouellette et al. 1997; Hubel, Krobisch et al. 1997; Mottram, Brooks et al. 1998), ou l'analyse de gènes de résistance aux médicaments sur des parasites manipulés au laboratoire (Cotrim, Garrity et al. 1999; Perez-Victoria, Perez-Victoria et al. 2001). Ces études ont permis l'identification de plusieurs gènes importants pour la biologie du parasite, qui sont actuellement en cours de validation comme cibles de nouvelles drogues (Selzer, Chen et al. 1997; McKerrow, Engel et al. 1999), ou pour le développement et l'utilisation de mutants atténués comme vaccins vivants (Titus, Gueiros-Filho et al. 1995; Streit, Recker et al. 2001). Il est important de signaler que la quasi-totalité des études effectuées jusqu'à présent sur la virulence du parasite *Leishmania* sont basées soit sur des clones de laboratoire qui ont perdu leur virulence après une culture prolongée, soit sur des parasites génétiquement manipulés par des expériences de mutagenèse, d'invalidation ou de surexpression de gènes. Il est donc possible que les conclusions relatives

aux gènes de virulence identifiés dans ces conditions ne soient pas réellement pertinentes en ce qui concerne la pathogénicité naturelle du parasite dans les foyers de transmission.

5 Dans le but d'étudier les bases moléculaires de la virulence du parasite, en évitant le biais méthodologique lié à l'utilisation de souches de laboratoire, les inventeurs ont dans un premier temps isolé des souches sauvages de *Leishmania (L.) major* présentant des niveaux différents de virulence. *L. major* est l'agent de la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ), qui sévit
10 chez l'homme de façon épidémique sur une aire très large qui s'étend sans discontinuité de la Mauritanie jusqu'en Mongolie. Les inventeurs ont identifié des isolats de *L. major*, obtenus de lésions humaines de LCZ, tous obtenus durant la même saison de transmission, et qui diffèrent dans leur pathogénicité dans le modèle expérimental de l'infection des souris sensibles BALB/c (exemple 1). Les différences dans le pouvoir pathogène
15 expérimental corrélient avec des différences de croissance *in vitro*, ce qui reflète des variations dans la biologie de ces isolats sauvages.

La technique de "*Differential Display*" (Liang and Pardee 1992; Liang, Bauer et al. 1995) a ensuite été utilisée pour identifier des gènes différentiellement exprimés entre des isolats complètement différents dans
20 leur pouvoir pathogène expérimental chez la souris BALB/c (deux isolats très virulents et deux autres peu virulents). Cette technique permet l'étude de gènes qui s'expriment à des niveaux différents sans connaître, au préalable, leur séquence. Trois transcrits préférentiellement exprimés dans les deux isolats les plus virulents ont ainsi été identifiés. L'un de ces
25 transcrits a été entièrement caractérisé grâce au criblage d'une banque d'ADNc de *L. major*. L'analyse de la séquence a montré une homologie avec la famille des protéines disulfide isomérases (PDI, Erp60 et Erp72) des eucaryotes. Cette nouvelle protéine a été désignée LmPDI pour les raisons suivantes : tout comme les autres membres de la famille des PDI,
30 (i) LmPDI possède deux domaines actifs CGHC, (ii) la région N-terminale

de cette protéine contient une séquence signal potentielle et, dans la région carboxy-terminale, un signal potentiel pour la rétention dans le reticulum endoplasmique (EEDL), (iii) elle peut s'organiser sous forme de structure oligomérique, (iv) la protéine recombinante produite dans *E. coli* exprime une activité PDI *in vitro*. Par ailleurs, en dehors des régions conservées sus-mentionnées, il y a très peu de similitudes entre LmPDI et les autres PDI déjà décrites. En fait, la famille des PDI comprend plusieurs molécules très divergentes impliquées dans les processus de maturation des protéines sécrétées dans le reticulum endoplasmique (Noiva 1999; Frand, Cuozzo et al. 2000). Les PDI sont des protéines multi-fonctionnelles qui interviennent dans les mécanismes complexes de rétention, réparation, régulation de l'expression, elles assistent les changements de conformation pour ne permettre la sortie du reticulum endoplasmique que des protéines correctement repliées. En plus de leurs fonctions enzymatiques (réduction et isomérisation), d'autres fonctions ont été récemment attribuées aux PDI ; elles incluent les activités chaperonnes, la fixation aux peptides et l'adhésion cellulaire (Ferrari and Soling 1999). Il est intéressant de souligner que LmPDI est exprimée de façon prédominante dans les isolats les plus virulents (exemple 2). Au total, l'ensemble de ces résultats suggère que LmPDI joue un rôle important dans la virulence naturelle du parasite *Leishmania*, et peut donc constituer une nouvelle cible pour la chimiothérapie ou la vaccination.

De plus, des données récentes sur l'implication de l'équivalent bactérien des PDI (Martin 1995; Ostermeier, De Sutter et al. 1996) (appelé DsbA pour *disulfide bond*) suggèrent le rôle que cette protéine peut jouer dans la pathogénicité de différents microorganismes (Yu and Kroll 1999). L'inactivation du gène DsbA affecte de façon dramatique la survie et la virulence de *Shigella flexneri* (Yu 1998; Yu, Edwards-Jones et al. 2000). DsbA est par ailleurs impliquée dans la genèse de l'entérotoxine de *Vibrio cholerae* (Peek and Taylor 1992; Yu, Webb et al. 1992). DsbA est aussi

importante pour la pathogénicité des espèces de *Escherichia coli* pathogènes : chez les espèces pathogènes pour le tractus urinaire, elle catalyse la formation des ponts disulfures d'une protéine chaperonne spécifique du pili (Zhang and Donnenberg 1996). Chez les espèces entéro-pathogènes, elle est aussi requise pour la stabilité et la formation des pili (Hultgren, Abraham et al. 1993; Wang, Bjers et al. 2000).

La présente demande constitue la première description suggérant un rôle important des PDI comme facteur de virulence d'un parasite protozoaire. La LmPDI pourrait exercer ses effets en assistant les changements de conformation et la stabilité d'autres facteurs essentiels pour la biologie et la pathogénie du parasite *Leishmania*. L'identification de tels facteurs serait extrêmement intéressante pour une meilleure compréhension de la biologie de ce parasite, et pour la mise au point de nouveaux traitements ou vaccins contre les leishmanioses.

L'invention porte donc en premier lieu sur une protéine impliquée dans la virulence de *Leishmania*, comportant au moins un site (Cys-Gly-His-Cys) identique au site actif potentiel d'une protéine de la famille des protéines disulfides isomérases (PDI). Cette protéine est de préférence une protéine codée par le parasite lui-même.

En particulier, l'invention porte sur la protéine LmPDI de *Leishmania major*, de séquence SEQ ID No: 2, et sur tout variant fonctionnel de la LmPDI, présentant au moins 40% d'identité, et de préférence au moins 80%, avec la LmPDI.

On définira ici un « variant fonctionnel de la LmPDI » comme une protéine capable de compléter la LmPDI dans un test d'infectivité effectué avec une souche de *L. major* dans laquelle le gène de la LmPDI aurait été inactivé. On désigne ici, par test d'infectivité, tout test permettant d'évaluer des propriétés biologiques relatives à la croissance du parasite

classiquement associées à la virulence. En particulier, on peut citer les trois types de tests suivants :

- 5 - Cinétique de croissance en milieu liquide de la forme promastigote du parasite , par exemple par une technique du type de celle décrite au point 2 de l'exemple 5 ;
- Capacité d'infection des macrophages de souris cultivés en vitro, par une technique telle que celle décrite à l'exemple 6 et dans l'article de Kebaïer et al, 2001 ;
- 10 - Capacité d'induire la leishmaniose murine expérimentale par infection de souris sensibles (BALB/c par exemple). La technique est détaillée par exemple au point 3 de l'exemple 5, et dans l'article de Kebaïer et al, 2001.

15 Les pourcentages d'identité avec la LmPDI seront évalués en utilisant le logiciel CLUSTAL W version 1.8 (Thompson, J.D., Higgins, D.G. et Gibson, T.J.), ou le logiciel BOXSHADE version 3.21 (Hoffman, K. et Baron, M.), qui ont donné des pourcentages d'identité de la LmPDI avec des protéines de la famille des PDI de plusieurs espèces entre 27 et 36 % (exemple 2).

20 Un deuxième mode de réalisation de l'invention concerne un polypeptide recombinant comportant au moins un fragment de plus de 10 acides aminés d'une protéine telle que celles définies ci-dessus, le cas échéant fusionné à un autre fragment polypeptidique, ledit polypeptide recombinant étant susceptible de déclencher une réaction immunologique contre un épitope de la LmPDI, lorsqu'il est administré à un animal. L'invention porte également sur un polypeptide recombinant comportant au moins un

25 fragment de plus de 10 acides aminés d'une protéine telle que celles définies ci-dessus, le cas échéant fusionné à un autre fragment polypeptidique, ledit polypeptide recombinant étant susceptible d'être reconnu par des anticorps dirigés contre la protéine LmPDI.

Dans tout ce qui précède et suit, le terme « polypeptide » doit être compris au sens large, c'est-à-dire incluant des séquences d'au moins 10 acides aminés (ou davantage lorsque cela est précisé), comprenant ou non des motifs glycosylés ou des glycolipides, et quelle que soit sa structure, primaire, secondaire ou tertiaire. Le fragment de la LmPDI présent dans les polypeptides recombinants de l'invention décrits ci-dessus peut présenter une taille supérieure à 15, 20, 30, 50 ou 100 acides aminés, et même davantage.

La LmPDI, recombinante ou purifiée à partir de cellules infectées, ainsi qu'un polypeptide de l'invention, peuvent être utilisés pour immuniser un hôte, humain ou animal, afin de le protéger de la leishmaniose ou de produire et récupérer des anticorps dirigés contre la LmPDI, comme cela est décrit à l'exemple 2.

Un polypeptide recombinant particulier selon l'invention est la protéine LmPDI-(His)₆ de séquence SEQ ID No :3, décrite à l'exemple 2.

Un autre exemple de polypeptide recombinant selon l'invention est une protéine de fusion entre un fragment de la LmPDI, comportant au moins un épitope de la LmPDI, et un polypeptide porteur favorisant la présentation de ce fragment au système immunitaire. Il peut s'agir, notamment, d'une fusion de tout ou partie de la LmPDI avec un fragment de la β -lactamase, d'une anatoxine tétanique ou diphtérique, ou de tout autre polypeptide d'un organisme pathogène, notamment d'origine parasitaire, bactérienne ou virale.

Un autre aspect de l'invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que ceux décrits ci-dessus. Une séquence d'acide nucléique préférée comprend la séquence codante de la LmPDI, correspondant aux nucléotides 241 à 1674 de la séquence SEQ ID No : 1, ou un fragment de cette séquence de taille supérieure ou égale à

30 nucléotides, de préférence supérieure à 100 nucléotides, codant pour un polypeptide comportant au moins un épitope caractéristique de la LmPDI.

L'invention porte aussi sur un vecteur d'acide nucléique comprenant une séquence d'acide nucléique de l'invention. Par exemple, il peut s'agir d'un plasmide, d'un cosmide, d'un phage, ou d'un virus. De façon préférée, un vecteur de l'invention permettra l'expression, dans une cellule hôte, d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention. En particulier, un vecteur de l'invention peut permettre l'expression, dans une bactérie ou une cellule eucaryote, de la LmPDI.

L'invention porte aussi sur une cellule en culture comprenant un vecteur tel que ceux décrits ci-dessus. Cette cellule peut être une bactérie, une levure, une cellule d'insecte, une cellule de mammifère, ou tout autre type de cellule. Elle peut être utilisée soit pour exprimer et éventuellement produire une protéine ou un polypeptide selon l'invention, soit pour produire un vecteur qui servira ensuite à exprimer une protéine ou un polypeptide selon l'invention dans un autre type cellulaire en culture, ou *in vivo*. A titre purement illustratif et non limitatif, on peut citer les cellules CHO, VERO, BHK21 et les cellules d'insectes, comme types cellulaires utilisables *in vitro* dans le cadre de la présente invention. De même, on peut citer le BCG et *Salmonella typhimurium* comme cellules utilisables *in vivo*. Enfin, il est important de noter que l'administration à un individu, d'un vecteur viral, par exemple le virus de la vaccine, ou d'ADN, codant pour un polypeptide ou une protéine tels que décrits ci-dessus, à des fins vaccinales, entre également dans le cadre de la présente invention.

Un cellule particulière de l'invention est la souche bactérienne LmPDI-XL₁, déposée à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM) le 31/01/2001 sous le numéro I-2621. Cette souche est dérivée d'une bactérie XL1-Blue MRF' strain de génotype $\Delta(mrcA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZ \Delta M15$

Tn10 (Tet^r)], transformée par le plasmide pBK-CMV-LmPDI. Ce plasmide correspond au plasmide pBK-CMV commercialisé par Stratagene (La Jolla, CA), dans lequel a été rajouté l'ADNc de la LmPDI, entre les sites de restriction *EcoR* I et *Xho* I.

5 L'invention porte également sur une sonde d'acide nucléique qui s'hybride spécifiquement, en conditions stringentes, avec la séquence nucléique correspondant aux nucléotides 241 à 1674 de la séquence SEQ ID No : 1, permettant ainsi de déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant pour la LmPDI, dans un échantillon biologique.

10 On définira ici des « conditions d'hybridation stringentes » comme des conditions qui permettent l'hybridation spécifique de deux molécules d'ADN à environ 65°C, par exemple dans une solution de 6X SSC, 0.5% SDS, 5X solution Denhardt's et 100 µg/ml of d'ADN non spécifique dénaturé, ou
15 n'importe quelle solution de force ionique équivalente, et après une étape de lavage réalisée à 65°C, par exemple dans une solution d'au plus 0.2X SSC et 0.1% SDS, ou n'importe quelle solution de force ionique équivalente. Toutefois, la stringence des conditions peut être adaptée par l'homme du métier, en fonction de la taille de la séquence à hybrider, son contenu en nucléotides GC, et de n'importe quel autre paramètre, par
20 exemple suivant les protocoles qui sont décrits dans in Sambrook et al., 2001 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd Ed., laboratory press, Cold Spring Harbor, New York).

Dans la définition ci-dessus, et dans l'ensemble du présent texte, le terme
25 « spécifique » est à comprendre au sens large du terme, habituellement donné dans les laboratoires. Ainsi, une molécule A reconnaît spécifiquement une molécule B si, dans un mélange complexe, la molécule A a une affinité pour la molécule B significativement supérieure à son affinité pour les autres molécules du mélange, de telle façon qu'il soit possible de détecter la molécule B par l'intermédiaire de la molécule A.

Les conditions de stringence utilisées ici sont celles qui permettent de détecter les PDI des différentes espèces leishmaniennes et non celles de l'hôte et d'autres microorganismes en présence d'une sonde radiomarquée synthétisée à partir du cDNA de la LmPDI.

5 Par exemple, une sonde de l'invention, qui s'hybride spécifiquement avec la séquence correspondant aux nucléotides 241 à 1674 de la séquence SEQ ID No : 1 en conditions stringentes, est telle qu'un *Southern blot* effectué en utilisant cette sonde marquée, présente, lorsqu'il est effectué sur un échantillon d'ADN de cellules infectées par une souche de *L. major* 10 exprimant la LmPDI, au moins une bande nettement distincte, et d'intensité supérieure aux autres bandes (non spécifiques), ladite bande n'apparaissant pas sur un *Southern blot* effectué dans les mêmes conditions, sur un échantillon d'ADN de cellules non infectées par une souche de *L. major*.

15 Un autre aspect de l'invention est une amorce nucléotidique permettant l'amplification spécifique d'au moins une partie de la séquence de SEQ ID No : 1, à partir de cellules infectées par *Leishmania*, permettant ainsi de déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant la LmPDI, dans un échantillon biologique. L'amplification sera dite 20 « spécifique » dès lors que la réaction d'amplification, réalisée à partir de cellules contrôle non infectées par *Leishmania*, ne conduit à l'amplification significative d'aucune séquence, alors que la même réaction, réalisée sur un échantillon contenant la séquence nucléotidique de SEQ ID No :1, conduit à l'amplification d'au moins un fragment de cette séquence.

25 Les sondes et amorces mentionnées ci-dessus peuvent le cas échéant être marquées, et/ou présentées dans des trousse de diagnostic, qui font également partie de l'invention. En effet, il peut être avantageux de déterminer la présence et, éventuellement, le niveau d'expression du gène de la LmPDI lors d'une infection par *Leishmania*, par exemple pour

déterminer la charge parasitaire et/ou l'opportunité d'un traitement impliquant l'utilisation d'un inhibiteur de la LmPDI.

5 Dans un autre mode de réalisation, l'invention porte sur des anticorps purifiés, reconnaissant spécifiquement la LmPDI. Il peut s'agir d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux, humains, humanisés, ou animaux. Ces anticorps peuvent être purifiés, par exemple, sur une colonne d'affinité LmPDI, en utilisant le protocole décrit dans la partie expérimentale. De tels anticorps spécifiques de la LmPDI peuvent trouver plusieurs applications.

10 Ils peuvent servir à détecter la présence de la LmPDI dans un échantillon biologique, par exemple pour diagnostiquer une leishmaniose et/ou déterminer l'opportunité d'utiliser un inhibiteur de la LmPDI pour traiter cette leishmaniose.

15 L'invention concerne donc aussi une méthode de diagnostic *in vitro* d'une infection par un parasite responsable de la Leishmaniose. Une telle méthode peut être réalisée en utilisant un polypeptide ou une protéine de l'invention, ou un anticorps dirigé contre cette protéine, ou encore à l'aide de sondes telles que décrites ci-dessus.

Une méthode de diagnostic particulière de l'invention comprend les étapes suivantes :

- 20 - la mise en contact d'au moins un anticorps selon l'invention avec un prélèvement biologique d'un sujet partiellement infecté par un parasite responsable de la Leishmaniose, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immun entre ledit anticorps et les protéines antigéniques contenues dans le prélèvement,
- 25 - la détection dudit complexe.

La détection du complexe peut se faire à l'aide de n'importe quel moyen connu de l'homme du métier (réaction enzymatique, transfert de fluorescence ou autre).

Les anticorps de l'invention peuvent être compris dans des trousse de diagnostic, au même titre que les sondes et les amorces mentionnées ci-dessus.

5 Des trousse de diagnostic pour la mise en œuvre de la méthode ci-dessus font partie intégrante de la présente invention.

A titre d'exemple, une telle trousse peut comprendre

- au moins un anticorps selon l'invention,
- un milieu approprié à la formation de complexe immun entre les protéines antigéniques contenues dans le
10 prélèvement analysé et ledit anticorps,
- des réactifs permettant la détection des complexes ainsi formés,
- le cas échéant, des échantillons témoins.

15 Alternativement, les anticorps de l'invention peuvent entrer dans la composition d'un médicament destiné à la prophylaxie, à l'atténuation, ou au traitement de certaines leishmanioses.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'invention porte sur une composition immunogène, comportant une protéine et/ou un polypeptide recombinant et/ou une séquence d'acide nucléique et/ou un vecteur et/ou
20 une cellule de l'invention tels que décrits précédemment, ladite composition immunogène étant capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec un parasite *Leishmania*. Une composition immunogène préférée de l'invention est capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées
25 provenant d'individus ayant été en contact avec *Leishmania major*.

Dans une réalisation préférée des compositions immunogènes de l'invention, ces compositions présentent une formulation

pharmaceutiquement acceptable pour être administrée à un hôte humain ou animal.

Les inventeurs ont montré que la LmPDI était susceptible d'induire *in vitro* la production de cytokines par des cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec *L. major*, et que le profil d'expression des cytokines correspondait à celui observé lors d'une réponse immunitaire de type Th1 (exemple 3). Une composition immunogène telle que celles décrites ci-dessus, capable d'induire une réponse immunitaire de type Th1 lorsqu'elle est administrée à un hôte, humain ou animal, constitue donc une réalisation particulièrement préférée de l'invention.

L'invention porte également sur une composition vaccinnante comportant une protéine, et/ou un polypeptide recombinant, et/ou une séquence d'acide nucléique, et/ou un vecteur, et/ou une cellule de l'invention telle que décrite précédemment, ladite composition vaccinnante étant destinée à protéger un hôte, humain ou animal, contre la leishmaniose. De préférence, les compositions vaccinnantes de l'invention sont formulées de façon acceptable sur le plan pharmaceutique pour être administrées à un hôte humain ou animal.

Une telle composition vaccinnante peut se présenter sous forme de liquide à injecter au patient, par voie sous-cutanée ou intra-musculaire, ou sous forme de vaccin oral, sous forme de pommade, ou encore sous forme de particules liées à une séquence nucléotidique de l'invention, par exemple par adsorption d'ADN à la surface des particules. Cette dernière forme permet l'administration du vaccin par « bombardement » (ou « *gene gun* »). Il est important de noter que les formulations de compositions vaccinnantes mentionnées ici le sont uniquement à titre d'exemples, et ne sont en aucun cas restrictives.

Les compositions immunogènes et/ou vaccinnantes de l'invention peuvent aussi comporter un ou plusieurs antigène(s) hétérologue(s) vis-à-vis de

Leishmania, et/ou une ou plusieurs séquence(s) d'acide nucléique codant pour de tels antigènes. Les compositions de l'invention peuvent donc déclencher une réaction immunologique vis-à-vis de plusieurs pathogènes différents et, le cas échéant, constituer des polyvaccins.

5 Le processus de vaccination, ainsi que les doses d'agent actif, devront être adaptés au type de vaccin utilisé et au mammifère auquel il est administré.

Des procédés de vaccination contre *Leishmania*, consistant à administrer à un hôte, humain ou animal, une composition comportant une protéine, et/ou un polypeptide recombinant, et/ou une séquence d'acide nucléique, et/ou
10 un vecteur, et/ou une cellule de l'invention tels que ceux décrits plus haut, entrent également dans le cadre de la présente invention.

La mise en valeur du rôle de la LmPDI dans la virulence de *Leishmania* permet aussi d'envisager des nouvelles stratégies de recherche de molécules actives pour inhiber la croissance du parasite. En effet, il a été
15 montré, qu'une molécule inhibitrice de la PDI, par exemple telle que la bacitracine ou l'acide chloromercurilbenzenesulfonique (pCMBS) inhibe la croissance de *Leishmania* en milieu liquide (exemple 4). L'invention porte donc aussi sur un procédé de criblage de molécules susceptibles d'inhiber la croissance de *Leishmania major*, comportant une étape d'évaluation de
20 la capacité desdites molécules à inhiber l'activité de la LmPDI. Les Protéines Disulfides Isomérases présentent en général plusieurs activités telles que, notamment, des activités d'oxydo-réduction, d'isomérase, et de chaperonne. Les procédés de criblage selon l'invention peuvent porter sur l'inhibition de n'importe laquelle des fonctions de la LmPDI.

25 Dans un procédé de criblage particulier de l'invention, l'étape d'évaluation de la capacité d'une molécule à inhiber l'activité de la LmPDI est effectuée dans un test de réactivation de la RNase A réduite et dénaturée, comportant les étapes suivantes :

- incubation de la RNase A réduite et dénaturée en présence de LmPDI, dans des conditions permettant sa réactivation,
- incubation de la RNase A réduite et dénaturée dans des conditions identiques à celles permettant sa réactivation par la LmPDI, en ajoutant la molécule à tester,
- comparaison des résultats obtenus en absence et en présence de la molécule à tester, un défaut de réactivation de la RNase A en présence de la molécule testée révélant que cette molécule possède une activité inhibitrice de la LmPDI.

10 N'importe quel autre test d'activité des PDI peut être utilisé dans les procédés de criblage selon l'invention, en particulier n'importe quel test dérivé du protocole initial décrit par Lyles et Gilbert (1991).

15 Un procédé de criblage selon l'invention peut aussi comporter un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* en milieu liquide et, le cas échéant, un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* dans un modèle murin de leishmaniose expérimentale. Un exemple d'un tel procédé est détaillé dans la partie expérimentale, à l'exemple 5.

20 Les molécules actives criblées par le procédé tel que défini ci-dessus sont caractérisées par leur capacité à inhiber ou à moduler la croissance de *Leishmania major*.

25 Les résultats obtenus avec la bacitracine, et présentés dans l'exemple 4, montrent qu'un inhibiteur des PDI peut inhiber la croissance de *Leishmania*. L'utilisation d'un ou plusieurs inhibiteurs des Protéines Disulfides Isomérases (PDI), pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prophylaxie, à l'atténuation, ou au traitement d'une infection par *Leishmania*, fait donc aussi partie intégrante de l'invention. Parmi les composés possédant une activité anti-PDI et pouvant être utilisés suivant l'invention, on peut citer des anticorps anti-PDI ou anti-LmPDI, la

bacitracine, l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), l'acide p-chloromercuribenzenesulfonique (pCMBS), ou l'acide tocinoïque.

Les compositions préparées suivant les utilisations ci-dessus sont de préférence administrables à un hôte humain ou animal, par voie topique,
5 orale ou parentérale.

La présente invention porte aussi sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection par *Leishmania*, comportant au moins un anticorps spécifique de la LmPDI et/ou toute molécule qui inhibe l'activité PDI. Une telle composition est de préférence appropriée pour une
10 administration topique, orale ou parentérale.

Des procédés de traitement des leishmanioses, comportant l'administration au patient, humain ou animal, d'un inhibiteur des PDI ou de la LmPDI, qu'il s'agisse d'un anticorps ou de tout autre type de molécule, entrent également dans le cadre de la présente invention.

15

Les exemples et figures ci-après, montrent les expériences biologiques qui ont été réalisées dans le cadre de cette invention et lui apportent le support expérimental requis, sans toutefois en limiter la portée. Ils illustrent aussi, de manière non restrictive, certains aspects de la mise en œuvre et de
20 l'intérêt de la présente invention.

Légende des figures :

La figure 1 illustre l'analyse par "Differential Display" (DD) de l'expression de gènes de *Leishmania major* dans les deux isolats les plus virulents (94 et 67, V) et les deux isolats les moins virulents (32 et 07, v).
25

La figure 1A représente une portion d'un gel de séquençage après autoradiographie, montrant les produits amplifiés par PCR à l'aide d'un

décamère arbitraire et d'une amorce oligo dT. Les ADNc différentiellement exprimés sont indiqués par des flèches. L'ADNc p14 est indiqué par un astérisque.

La figure 1B représente l'analyse par Northern blot de l'expression d'un gène identifié par la technique de DD entre les isolats les plus virulents (94 et 67, V) et les isolats les moins virulents (32 et 07, v). Les ARNm extraits à partir des promastigotes des différents isolats en phase stationnaire de croissance ont été hybridés avec la sonde radiomarquée p14. Après autoradiographie, les blots ont été déshybridés puis réhybridés avec une sonde spécifique du gène de l' α -tubuline de *L. major* (α -tub).

La figure 2 représente la séquence nucléotidique de l'ADNc (SEQ ID No : 1) de la LmPDI et sa séquence déduite en acides aminés (SEQ ID No : 2). Les nucléotides en minuscule représentent les régions non traduites. La séquence « leader » (SL) de 18 nt est soulignée et la séquence potentielle du signal de polyadénylation est encadrée. La séquence potentielle du peptide signal est représentée par des lettres en gras. Les sites actifs potentiels de la LmPDI sont doublement soulignés et la séquence probable de rétention dans le réticulum endoplasmique est indiquée d'un trait discontinu.

La figure 3 montre l'alignement de la séquence en acide aminés de la LmPDI avec des protéines disulfide isomérases de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*, GenBank accession no. : P12865), *Hypocrea jecorina* (*H. Jecorina*, 074568), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, 017908), *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhard*, 048949), *Drosophila melanogaster* (*D. melano*, P54399), *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*, Q27553), and *Homo sapiens* (*H. sapiens*, P072237). Les lettres encadrées en noir indiquent les acides aminés identiques et celles encadrées en gris indiquent les acides aminés similaires. Des «trous» ont été introduits pour obtenir le maximum de similarité entre les séquences alignées et sont indiqués par des tirets.

Deux logiciels ont été utilisés pour la réalisation des alignements :

- CLUSTAL W version 1.8

5 Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.

- BOXSHADE version 3.21

10 Hoffman, K. and Baron, M.

La figure 4 illustre l'analyse du rôle de la LmPDI recombinante dans la réactivation de la RNase réduite et dénaturée. La RNase A réduite et dénaturée (8µM) a été incubée dans un tampon contenant 4.5mM (cCMP), 1mM Glutathione GSH, 0.2mM Glutathione disulfide GSSH, 2mM EDTA et 15 100mM Tris-HCl pH 8 en présence de Sérum albumine bovine (BSA) (1.4µM) comme contrôle négatif, de Protéine Disulfide Isomérase bovine (1.4µM) comme contrôle positif, ou de LmPDI recombinante (1.4µM) pendant 30 minutes à 25°C. La réactivation de la RNase A est déterminée par la mesure de l'activité RNase A à 296nm toutes les 5 minutes pendant 20 30minutes (Lyles and Gilbert 1991).

La figure 5A montre l'analyse par Southern blot du nombre de copies du gène de la LmPDI dans le génome de *Leishmania major*. 8µg de l'ADN génomique l'isolat 94 de *L. major* sont digérés par les enzymes de restriction suivantes : *Ava*I, *Eco*RV, *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI, *Xho*I, *Nco*I, *Sac*I, 25 *Sph*I. Les enzymes marquées d'un astérisque coupent une seule fois à l'intérieur de l'ADNc de la LmPDI.

La figure 5B montre l'analyse par Southern blot du gène de la LmPDI dans différentes espèces de *Leishmania*. 8µg de l'ADN génomique de *L. major* (94), *L. infantum* dermatrope (*L. infantum* MC), *L. infantum* viscérotrope (*L. infantum* Visc) ; *L. donovani* sont digérés par l'enzyme *Pst* I. Les ADN génomiques sont hybridés dans ces expériences par la sonde représentant 30 l'entière séquence de l'ADNc de la LmPDI.

La figure 6 montre l'immunodétection de la LmPDI native chez *L. major* avec différentes préparations d'anticorps anti-LmPDI. 20µg de protéines totales de promastigotes de GLC 94 dans du tampon de Laemmli (piste 1) ou en présence de 0.5mM de DTT (piste 2) et 0.05µg de LmPDI produite dans les bactéries *E. coli* et purifiée (rLmPDI) (piste 3) sont soumis à une électrophorèse puis transférés sur une membrane de nitrocellulose, puis révélés avec l'immunsérum anti-LmPDI (piste 1) ou les anticorps anti-LmPDI purifiés sur colonne d'affinité (pistes 2 et 3).

La figure 7 représente l'analyse par Western blot de l'expression de la LmPDI dans les deux isolats les plus virulents (94, 67, V) et les deux isolats les moins virulents (32, 7, v) de promastigotes. 20µg de protéines totales de promastigotes en phase stationnaire de croissance des différents isolats sont soumis à une électrophorèse puis transférés sur une membrane de nitrocellulose qui est incubée en présence de l'anticorps polyclonal anti-LmPDI. Les flèches (>) indiquent les 3 protéines reconnues par l'immunsérum anti-LmPDI.

La figure 8 représente la prolifération des cellules mononucléées d'individus vivant dans un foyer de leishmaniose cutanée zoonotique en Tunisie, après incubation de LmPDI (5 µg/ml). Les cellules lymphomonocytaires sont récupérées, lavées par 3 centrifugations successives avec du milieu RPMI-PS/Glu (30 ml puis deux fois 10 ml) puis comptées et incubées à la concentration de 10^6 cellules/ml de milieu en présence ou en absence d'une concentration de 5 µg/ml de LmPDI. Après 5 jours de culture, la stimulation lymphocytaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée. Le résultat est exprimé en CPM.

La figure 9 représente le résultat d'un test d'inhibition de la croissance des parasites (*L. major*) en milieu liquide, par la Bacitracine. Il s'agit des courbes de croissance sur 96 heures, de promastigotes de *L. major* en présence de 0, 1 mM, 1,5 mM, ou 2 mM de Bacitracine.

La figure 10 montre l'effet de la bacitracine (BAC), de la bacitracine de zinc (BACZn) du p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA) et de l'acide tocinoic (TOC) sur l'activité *in-vitro* de la LmPDI recombinante. Différentes concentrations d'inhibiteurs (0 à 2mM) ont été utilisées pour suivre l'effet des inhibiteurs de PDI sur la capacité de la LmPDI à réactiver *in-vitro* la RNase A réduite et dénaturée. Comme contrôle positif (T) de ces expériences, la LmPDI sans inhibiteurs a été utilisée.

La figure 11 montre l'effet de la bacitracine (BAC) (figure 11A), de la bacitracine de zinc (BACZn) (figure 11B), du 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNMB) (figure 11C) et du p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA) (figure 11D) sur la croissance *in-vitro* des leishmanies en milieu liquide. Différentes concentrations d'inhibiteurs (0 à 5mM) ont été utilisées pour suivre l'effet des inhibiteurs de PDI sur la multiplication des parasites *in-vitro*. Comme contrôle de ces expériences, les parasites non traités avec les inhibiteurs (T-) ont été choisis.

Exemples :

L'ensemble des résultats expérimentaux présentés dans les exemples suivants ont été obtenus avec les matériels et méthodes suivants :

Parasites et conditions de culture

Les isolats de *L. major* utilisés dans ce travail proviennent de lésions humaines de LCZ obtenus lors d'une étude résumée dans l'exemple 1. Les parasites ont été cultivés sur milieu NNN (milieu solide préparé à base d'agarose et de sang de lapin) à 26°C, et progressivement transférés dans du RPMI (SIGMA, St Louis, MO) contenant 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 10% de Sérum de Veau Foetal inactivé (milieu complet). Les promastigotes en phase logarithmique de croissance sont ajustés à 10⁶ parasites/ml dans un volume constant de milieu complet et incubés à 26°C. La phase stationnaire de croissance est

atteinte après 4 à 6 jours avec des densités de parasites allant de 3.10^7 à 8.10^7 . Ces promastigotes en phase stationnaire de croissance sont utilisés pour les extractions d'ARN et de protéines.

Extraction d'ARN et « Differential Display »

5 Les ARN totaux sont extraits à l'aide du réactif « TRIZOL » (Gibco-BRL). Les ARN polyA⁺ sont purifiés par passage sur colonne d'oligo dT / cellulose à l'aide du kit « poly A⁺ ARN isolation kit » (Amersham-Pharmacia) selon les instructions du fabricant. 200ng d'ARNm ont été utilisés dans une réaction de reverse-transcription de 20µl contenant 1µM
10 d'une amorce Oligo(dT)₁₁MN, avec M= A ou C ou G et N= A ou C ou G ou T (Genset), 1X Tampon First Strand (Gibco-BRL), 5µM dNTP (Amersham-Pharmacia), 10U de RNAsin (Promega) et 200U de Reverse-Transcriptase (Gibco-BRL).

Après incubation à 37°C pendant 1 heure, la réaction est stoppée par une
15 incubation de 5 minutes à 95°C. Les ADNc sont amplifiés par PCR à l'aide d'une combinaison de 12 oligo dT et de 10 décamères arbitraires. La PCR est effectuée dans un volume de 20µl contenant 2µl de la réaction de reverse-transcription, 0.2µM de l'amorce 5', 1µM de l'amorce 3', 2µM de dNTP, 10µCi [α^{35} S]dATP, 1X tampon « Taq DNA polymerase reaction
20 buffer » et 1U de Taq polymérase (Amersham-Pharmacia). Les réactions sont incubées dans un thermocycleur Perkin-Elmer 9600 pendant 40 cycles à 94°C pendant 30s, 40°C pendant 60s et 72°C pendant 30s suivis d'un cycle à 72°C pendant 6 minutes. Les produits de PCR sont analysés sur un gel de séquençage à 6% d'acrylamide. Le gel est séché sous vide sur un
25 papier Whatman 3MM et autoradiographié. Les ADNc différenciellement exprimés sont excisés du gel, élués et réamplifiés par PCR en présence des mêmes oligonucléotides et dans les conditions décrites précédemment. Les produits d'amplification sont clonés dans le vecteur pMOSblue à l'aide du kit « blunt-ended PCR cloning kit » (Amersham-Pharmacia) selon les

instructions du fabricant. Les fragments clonés sont séquencés grâce au kit « Sequencing Ready Reaction Kit » (Perkin-Elmer) et analysés à l'aide du séquenceur automatique ABI 377.

Analyse par Northern-Blot

5

10

15

200ng d'ARNm de promastigotes extraits durant la phase stationnaire de croissance des 4 isolats de *L. major* sont dénaturés, séparés sur un gel à 1,2% Agarose / 2,2 M formaldéhyde et transférés par capillarité sur une membrane « Hybond N⁺ » (Amersham-Pharmacia). Les acides nucléiques sont ensuite fixés par une cuisson de 2 heures à 80°C. Les fragments d'ADNc différenciellement exprimés et de l' α -tubuline sont marqués avec de l' [α^{32} P]dCTP en utilisant le kit « megaprime DNA labelling system kit » (Amersham-Pharmacia). Les hybridations sont effectuées dans une solution à 1X Denhardt's/6X SSC/ 0,1% SDS/ 0,1mg.ml⁻¹ d'ADN de sperme de saumon toute la nuit à 65°C. Les membranes sont lavées à 65°C dans une solution contenant 0,1X SSC/ 0,1% SDS et autoradiographiées.

Construction d'une banque d'ADNc et caractérisation de l'ADNc de la LmPDI

20

25

Une banque d'ADNc a été construite à partir de 5 μ g d'ARNm de promastigotes de la souche la plus virulente (GLC94) dans le vecteur ZAPII, selon les instructions du fabricant (Stratagene). 6 .10⁶ plages de lyse ont été criblées à l'aide de la sonde p14 marquée au [α^{32} P]P]dCTP en utilisant le kit « megaprime DNA labelling system kit » (Amersham-Pharmacia). Les plages de lyse d'intérêt sont prélevées et criblées de nouveau pour isoler les clones positifs des clones contaminants. Les clones positifs sont ensuite séquencés.

Analyse par Southern-Blot

10µg d'ADN génomique extraits à partir de promastigotes de la souche la plus virulence GLC94 ont été digérés avec les enzymes de restriction indiquées dans la figure 5, et analysés sur un gel d'agarose 0,6%, puis transférés sur une membrane hybond N⁺ (Amersham-Pharmacia). La membrane est incubée en présence d'une sonde radioactive marquée au [α^{32} P] dCTP et correspondant au clone entier de l'ADNc de la LmPDI. Les membranes sont ensuite lavées dans une solution contenant 0,1X SSC/0,1%SDS et autoradiographiées.

Expression et purification de la protéine recombinante LmPDI dans les bactéries *E. coli* BL21

La séquence correspondant au cadre de lecture ouvert de l'ADNc de la LmPDI (1371pb) dépourvu de la séquence codant pour le peptide signal a été clonée dans le vecteur d'expression bactérien pET-22b (Novagen). Les bactéries *E. coli* BL21 contenant le plasmide recombinant (pET-22b-LmPDI) sont cultivées dans du milieu LB puis la synthèse de la protéine recombinante est induite en présence de 1mM d'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) pendant 4 heures. La protéine recombinante LmPDI-(His)₆ (SEQ ID No : 3) est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel (Ni²⁺) (Amersham-Pharmacia). La pureté de la protéine produite est vérifiée par SDS-PAGE.

Production d'un anticorps polyclonal anti-LmPDI et analyse de l'expression de la protéine native par immunoblot.

Un lapin a été immunisé par une injection intramusculaire de 500µg de la LmPDI recombinante purifiée émulsifiée (v/v) dans de l'adjuvant de Freund incomplet (IFA, Sigma). Le lapin a reçu deux injections additionnelles de 500µg de protéine recombinante, la première par voie intramusculaire 15



jours après la première injection et la deuxième par voie intradermique 30 jours plus tard. Le lapin a été saigné 10 jours après la dernière injection, les sérums ont été récoltés et gardés à -80°C . Les lysats protéiques de promastigotes ont été dénaturés dans du tampon de Laemmli 1X pendant 10 minutes à 100°C , déposés sur un gel à 12% SDS-Acrylamide et électrotransférés sur une membrane de nitrocellulose (Millipore). Les membranes ont été incubées dans une solution de saturation PBS/0,1% Tween20 / 3% Lait écrémé à température ambiante pendant une heure puis dans la même solution contenant l'anticorps anti-LmPDI dilué au 1/1000^{ème} à 4°C pendant la nuit. Après 3 lavages dans du PBS/0,1% Tween20, les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham-Pharmacia, dilué au 1/1000) pendant une heure à température ambiante et lavées 3 fois dans du PBS/0,1% Tween20. Les complexes protéines-anticorps ont été révélés par la détection de l'activité peroxydase en utilisant le kit « ECL system » selon les instructions du fabricant (Amersham-Pharmacia).

Préparation de la RNase A réduite et dénaturée

20mg de Ribonucléase (RNase A) purifiée ont été réduits et dénaturés à température ambiante pendant 18 heures dans un tampon contenant 0,15 M de DTT, 6 M de guanidine-HCl et 0,1 M de Tris-HCl à pH 8,6 avant d'être purifiés sur une colonne de sephadex G-25 équilibrée dans du 0,01 M HCl. La concentration des fractions de RNase A réduite et dénaturée a été déterminée à l'aide du coefficient d'extinction de $9200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 275 nm. Les fractions sont conservées à -80°C pendant deux semaines.

Réactivation de la RNase A en présence de la protéine recombinante LmPDI

La RNase A réduite et dénaturée (8 μ M) a été incubée dans un tampon contenant 4,5 mM (cCMP), 1 mM Glutathione GSH, 0,2 mM Glutathione disulfide GSSH, 2 mM EDTA et 100 mM Tris-HCl pH 8 en présence de
5 Sérum albumine bovine (BSA) (1,4 μ M) comme contrôle négatif, de Protéine Disulfide Isomérase bovine (1,4 μ M) comme contrôle positif, ou de LmPDI recombinante (1,4 μ M) pendant 30 minutes à 25°C. La réactivation de la RNase A a été déterminée par la mesure de l'activité RNase A à
10 296nm toutes les 5 minutes comme précédemment décrit dans la littérature (Lyles and Gilbert 1991).

Exemple 1 : sélection d'isolats de *L. major*, présentant différents niveaux de virulence

15 Les isolats de *L. major* utilisés dans ce travail proviennent de lésions humaines de LCZ obtenus lors d'une étude prospective menée en 1994-1995 à El Guettar, au sud de la Tunisie (Louzir, Melby et al. 1998). Ils ont été choisis parmi 19 isolats sur la base de leur pouvoir pathogène lors de l'infection expérimentale de souris sensibles BALB/c : 2.10^6 amastigotes
20 des diver isolats ont été injectés dans les coussinets des pattes arrières des souris BALB/c, et la progression de la lésion a été observée toutes les semaines pendant 9 semaines. Cinq semaines après l'infection, la production d'IL-4 et d'IFN- γ par des cellules mononucléées de ganglions lymphatiques activés *in vitro* par des antigènes du parasite a été mesurée.

25 Ces expériences ont montré d'une part, une grande hétérogénéité dans la progression de la maladie induite par les différents isolats de *L. major* et, d'autre part, que l'utilisation d'un même isolat conduit à des résultats reproductibles.



Les souches les plus virulentes ont induit les plus haut taux d'IL-4 et les plus bas taux d'IFN- γ *in vitro*, 5 semaines après l'infection.

A partir de l'observation que l'expression clinique de l'infection par *L. major* est variable suivant les souches et reproductible avec chacune d'entre elles dans le modèle expérimental de l'infection des souris sensibles BALB/c, les inventeurs ont émis l'hypothèse que les gènes impliqués dans la virulence seraient différenciellement exprimés entre les isolats les plus virulents par rapport aux isolats les moins virulents. Une analyse préliminaire de l'expression d'un groupe de gènes préalablement décrits, par d'autres auteurs, et associés à la virulence du parasite, comprenant LPG1, LPG2, KMP-11, Cpc, Cpb, Hsp100, Gene B et gp63, a été réalisée par une technique de transcription inverse et d'amplification génique quantitative. Cette analyse n'a pas montré de différence entre les isolats de *L. major* exprimant une pathogénicité différente chez les souris BALB/c (Kebaier, Louzir et al. 2001).

Deux isolats, MHOM/TN/94/GLC94 et MHOM/TN/94/GLC67 (GLC94 et GLC67 respectivement) qui induisent des lésions graves, évoluant rapidement et représentant les isolats les plus virulents et 2 isolats MHOM/TN/94/GLC07 et MHOM/TN/94/GLC32 (GLC07 et GLC32 respectivement), induisant une maladie expérimentale moins sévère et représentant des isolats peu virulents, ont été sélectionnés pour poursuivre la recherche de gènes de virulence potentiellement exprimés à des niveaux différents suivant les souches.

Exemple 2 : Identification par « Differential Display », d'une nouvelle protéine disulfide isomérase LmPDI de *Leishmania major*, impliquée dans la virulence naturelle du parasite

1. Identification des gènes différenciellement exprimés dans les isolats virulents et les isolats peu virulents de *L. major*

Les ARNm ont été tout d'abord purifiés à partir des promastigotes de deux isolats très virulents (GLC94 et GLC67) et de deux isolats peu virulents (GLC 32 et 07) puis reverse-transcrits en ADNc en utilisant des amorces Oligo(dT)₁₁MN, avec M= A ou C ou G et N= A ou C ou G ou T. L'amorce utilisée lors des expériences de differential display est :

Les réactions d'amplification ont été réalisées par PCR à l'aide des mêmes oligo-dT utilisés lors de la réaction de reverse transcription et combinés avec 10 amorces arbitraires, telles que décrites dans la littérature scientifique (Liang and Pardee 1992; Liang, Bauer et al. 1995; Heard, Lewis et al. 1996).

Au total, 60 combinaisons d'amorces ont été réalisées et analysées. L'analyse sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification utilisant différentes combinaisons d'amorces a permis de montrer que les gènes des différents isolats de *L. major* (très virulents et peu virulents) expriment, dans approximativement 95% des cas, les mêmes ARNm et à des niveaux équivalents. Seuls, 25 messagers semblent être différentiellement exprimés entre les isolats très virulents et peu virulents (figure 1A). Les ADNc différentiellement exprimées ont été tout d'abord isolés du gel d'acrylamide puis réamplifiés à l'aide des mêmes combinaisons d'amorce utilisées lors de la première PCR et enfin, clonés dans le vecteur pMOS. Le séquençage des différents clones a permis de montrer qu'un certain nombre d'entre eux étaient identiques.

L'analyse de l'ARNm issu des différents isolats de *L. major* par Northern-blot en utilisant les 14 fragments différentiellement exprimés comme sonde a permis de montrer que 3 clones parmi les 14 isolés présentent une expression différentielle entre les isolats très virulents et les isolats peu virulents. Un de ces clones, le clone p14, a été caractérisé. Par Northern blot, la sonde correspondant au clone p14 s'hybride spécifiquement avec un transcrit de taille approximative de 2,2kb, qui est préférentiellement



exprimé dans les 2 isolats les plus virulents par rapport aux 2 isolats les moins virulents (figure 1B). Ceci confirme le résultat obtenu par la technique de *Differential Display*. Le clone p14 a été entièrement séquencé et la taille de ce clone est de 339pb. La comparaison de la séquence nucléotidique de ce fragment avec les séquences décrites dans les banques de données (GenBank et EMBL) n'a pas permis d'identifier de séquence significativement homologue. Ceci peut être dû au fait que le clone p14 correspond à la région 3' terminale non traduite du messenger.

2. Clonage et analyse de la séquence entière de l'ADNc p14

Pour isoler la séquence entière de l'ADNc correspondant au clone p14, le fragment de 339pb a été utilisé pour cribler une banque d'ADNc de promastigotes de l'isolat GLC94. Deux clones positifs ont été isolés à partir de 6×10^5 clones recombinants analysés. La figure 2 montre la séquence nucléotidique du clone le plus long, qui est de 2094pb (SEQ ID No :1). Ce clone présente un cadre de lecture ouvert codant pour un polypeptide de 477 acides aminés (aa), avec un poids moléculaire théorique de 52,4 kDa et un point isoélectrique de 5,22. La région N-terminale de cette protéine correspond à un peptide signal potentiel d'export vers le réticulum endoplasmique, de 20 aa. La région 5' non traduite contient une séquence « *splice leader* » caractéristique des *Leishmania* et la région 3' non traduite contient une queue poly A précédée d'un site potentiel de polyadénylation (figure 2).

La séquence peptidique du clone isolé montre 27-36% d'identité avec les protéines de la famille des Protéine Disulfide Isomérases (PDI et Erp) de plusieurs espèces (figure 3). De plus, cette protéine contient deux régions aux résidus 47-52 et 381-386 qui sont identiques aux sites actifs potentiels (Cys-Gly-His-Cys, ou CGHC) des PDI, Erp et protéines de la famille des thioredoxines. La partie C-terminale montre un signal potentiel de rétention dans le réticulum endoplasmique de type KDEL (EEDL) aux résidus 474-

477 suggérant que, comme les PDI et Erp, cette protéine se retrouve dans la lumière du réticulum endoplasmique. P14 est donc une protéine de la famille des Protéine Disulfide isomérases de *L. major*. Elle a été dénommée LmPDI (figure 2 et 3).

5 Pour déterminer si la LmPDI est dotée d'une activité thio-disulfide oxydo-réductase comme cela a été démontré pour la plupart des protéines disulfide isomérases décrites, la capacité de la protéine recombinante LmPDI à renaturer la RNase A dénaturée a été étudiée. La protéine recombinante LmPDI a été synthétisée chez *E. coli* puis purifiée et utilisée
10 dans un test, *in vitro*, de réactivation de la Rnase. Les résultats obtenus montrent que la LmPDI est capable de restaurer l'activité RNase A de manière similaire à celle de la PDI bovine, utilisée comme contrôle (figure 4)

15 Pour identifier le nombre de copies du gène codant pour le LmPDI, les inventeurs ont effectué une hybridation de type Southern blot en utilisant comme sonde le fragment d'ADNc de la LmPDI marquée au ^{32}P . Les résultats obtenus montrent généralement une bande unique, sauf pour les enzymes qui présentent un site de coupure au sein de l'ADNc de la LmPDI (figure 5A). Le gène codant pour la LmPDI est donc probablement présent
20 en une copie unique dans le génome de *L. major*. De plus, le gène de la LmPDI apparaît conservé dans différentes espèces de *Leishmania* testées (*Leishmania infantum*, dermatrope, et un viscérotrope, *Leishmania donovani*) (figure 5B).

3. Analyse par immunoblot de l'expression de la LmPDI

25 Pour caractériser l'expression de la protéine native, un lapin a été immunisé avec la protéine recombinante LmPDI synthétisée chez *E. coli* et purifiée par chromatographie d'affinité. Par immunoblot, les inventeurs ont montré que l'anticorps polyclonal anti-LmPDI obtenu reconnaît fortement une protéine de la taille attendue (55kDa) dans les lysats de promastigotes



en phase stationnaire de croissance de GLC94 (figure 6). D'autre part, deux autres protéines sont détectées. La première présente un poids moléculaire de 105 kDa, ce qui correspond à environ deux fois celui de la LmPDI, et la deuxième a un poids moléculaire de 35 kDa. Afin de vérifier si la protéine de 105 kDa correspond à un dimère de la LmPDI, une analyse de lysats de promastigotes de GLC94 dénaturés en présence de fortes concentrations de DTT (0.5mM) a été effectuée. Dans ces conditions, l'anti-LmPDI ne détecte plus de protéines à 105 kDa. Ces résultats suggèrent que la LmPDI s'organise en oligomères. La protéine de 35 kDa semble être un contaminant. En effet, l'anti-LmPDI purifié sur colonne d'affinité (Sepharose 4B-LmPDI) ne reconnaît plus la protéine de 35 kDa (figure 6).

Afin de comparer le niveau d'expression de la LmPDI entre les isolats les plus virulents et les moins virulents, les protéines de promastigotes ont été extraites puis quantifiées en phase stationnaire de croissance. 5µg de protéines ont été analysés sur un gel à 12% de polyacrylamide-SDS et transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'analyse par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-LmPDI montre que la LmPDI (55kDa) et son dimère (105kDa) sont plus fortement exprimés dans les isolats les plus virulents (figure 7). En revanche, la protéine contaminante de 35kDa est exprimée de manière équivalente quelle que soit la souche testée. Ces résultats suggèrent une corrélation entre le niveau d'expression de la LmPDI et le pouvoir pathogène des isolats étudiés.

Exemple 3 : Induction par la LmPDI de la prolifération *in vitro* de cellules mononucléées d'individus ayant des lésions actives ou des antécédents de LCZ

La LmPDI de *L. major*, vu son expression importante au cours du stade infectieux du parasite, pourrait être la cible d'une réponse immune cellulaire. Afin de vérifier la pertinence de cette hypothèse, la capacité de la LmPDI à induire une réponse immune cellulaire a été évaluée, par des

expériences de prolifération de cellules mononucléées obtenues d'individus ayant des lésions actives ou des antécédents de LCZ.

Cette étude a été réalisée chez 37 individus vivants à El Guettar (sud de la Tunisie) pour lesquels le résultat du test de prolifération cellulaire contre les antigènes totaux du parasite (SLA, test indiquant un contact antérieur avec le parasite) est disponible. Ces individus se répartissent comme suit :

Groupe 1 : composé de 8 individus ayant un test SLA négatif

Groupe 2 : composé de 29 individus ayant un test SLA positif

Les cellules mononucléées, comprenant les lymphocytes et les monocytes sont séparées à partir sang périphérique par centrifugation sur gradient de ficoll /Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Le résultat (figure 8) montre une prolifération significative avec les individus immuns.

L'induction des cytokines (IFN- γ IL-4) dans les surnageants de culture de PBMC a été faite par incubation pendant 48 heures des cellules mononucléées avec la même concentration de LmPDI et le dosage a été réalisé par un test ELISA utilisant des anticorps monoclonaux anti-IL-4 et anti-IFN- γ humaines (Pharmingen, San Diego, CA).

Les résultats ont été réalisés sur un échantillon faible d'individus. Ils montrent clairement l'absence d'IL-4 et la présence de taux significatifs d'IFN- γ dans le surnageant des cellules stimulées par la LmPDI.

Ce résultat montre une réponse essentiellement de type Th1, indiquant que la LmPDI pourrait constituer un candidat-vaccin contre les leishmanioses.

Exemple 4 : Inhibition de la croissance de *L. major* en milieu liquide, en présence d'un inhibiteur des PDI

La bacitracine est un inhibiteur connu des PDI. Des expériences utilisant la bacitracine montrent qu'à la concentration finale de 2 mM, la bacitracine inhibe complètement la croissance des parasites *L. major* en milieu liquide (figure 9).

5 Ces expériences ont été effectuées dans les conditions expérimentales suivantes :

a) Préparation de la RNase A réduite et dénaturée :

20mg de Ribonucléase (RNase A) purifiée ont été réduits et dénaturés à température ambiante pendant 18 heures dans un tampon
10 contenant 0.15M de DTT, 6M de guanidine-HCl et 0.1M de Tris-HCl à pH 8.6, avant d'être purifiés sur une colonne de sephadex G-25 équilibrée dans du 0.01M HCl. La concentration des fractions de RNase A réduite et dénaturée a été déterminée à l'aide du coefficient d'extinction de 9200 $M^{-1}cm^{-1}$ à 275nm. Les fractions sont conservées à -80°C pendant deux
15 semaines.

b) Réactivation de la RNase A en présence de la protéine recombinante LmPDI :

La RNase A réduite et dénaturée (8 μ M) a été incubée dans un tampon contenant 4.5 mM (cCMP), 1 mM Glutathione GSH, 0.2 mM
20 Glutathione disulfide GSSH, 2 mM EDTA et 100 mM Tris-HCl pH 8 en présence de Sérum albumine bovine (BSA) (1,4 μ M) comme contrôle négatif, de Protéine Disulfide Isomérase bovine (1,4 μ M) comme contrôle positif, ou de LmPDI recombinante (1,4 μ M) pendant 30 minutes à 25°C. La réactivation de la RNase A est déterminée par la mesure de l'activité
25 RNase A à 296 nm toutes les 5 minutes pendant 30 minutes comme précédemment décrit dans la littérature (Lyles and Gilbert 1991).

c) Tests d'inhibition *in-vitro* de l'activité thio-disulfide oxydo-réductase de la LmPDI recombinante par différents inhibiteurs de PDI :

Les conditions d'expériences relatives aux tests d'inhibition de l'activité thio-disulfide oxydo-réductase de la LmPDI recombinante sont strictement identiques à celles décrites dans le paragraphe (Réactivation de la RNase A en présence de la protéine recombinante LmPDI), excepté le fait que les réactions sont réalisées en présence de 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM et 2 mM des inhibiteurs de PDI suivants :

- la bacitracine
- la bacitracine de zinc
- le p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA)
- l'acide tocinoic.

d) Inhibition de la croissance des parasites (*L. major*) en milieu liquide

Dans le but de déterminer l'effet de la bacitracine (BAC), de la bacitracine de zinc (BACZn), du p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA) et du le 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) sur la croissance *in-vitro* des leishmanies en milieu liquide, différentes concentrations d'inhibiteurs cités ci-dessus 0mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM et 5mM sont additionnés dans du RPMI additionné de 5% se sérum de veau foetal et contenant $2 \cdot 10^6$ /ml de parasites en phase exponentielle de croissance. Les parasites sont incubés à 26°C et comptés toutes les 24 heures pendant 96 heures. Le comptage des parasites est réalisé sur cellules de Mallassez.

Exemple 5 : Evaluation de molécules inhibitrices de LmPDI dans leurs capacités à supprimer la croissance de *Leishmania major*

La mise en valeur du rôle de la LmPDI dans la virulence de *Leishmania* permet d'envisager des nouvelles stratégies de recherche de molécules

actives pour soigner les leishmanioses. En effet, il est probable que des molécules connues pour leur activités anti-PDI, autres que la bacitracine, soient capables d'inhiber la croissance du parasite. Un exemple de protocole d'évaluation de molécules potentiellement efficaces contre *Leishmania* est présenté ici.

L'évaluation de molécules connues pour leurs activités anti-PDI, ou celles qui seront nouvellement identifiées, peut se faire en trois étapes. Au cours de la première étape, les molécules sont testées *in vitro* sur la protéine LmPDI recombinante produite dans *Escherichia (E.) coli*. Ensuite, des tests d'inhibition de la croissance des parasites en milieu liquide sont réalisés et enfin, les molécules sont testées dans le modèle murin de la leishmaniose expérimentale.

1- Evaluation de l'inhibition de la LmPDI recombinante. La technique détaillée de l'analyse de l'activité PDI de LmPDI est décrite dans l'exemple 2 et dans les Matériels et Méthodes ci-dessus. La même technique peut être utilisée pour évaluer la capacité qu'ont certains inhibiteurs des PDI connus ou à identifier (en utilisant un modèle moléculaire de la LmPDI), en rajoutant dans le volume réactionnel différentes concentrations d'inhibiteurs potentiels. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au tampon seul. Ne sont retenues que les molécules qui ont une activité inhibitrice de LmPDI significative et dose-dépendante.

Dans le but de déterminer si les différents inhibiteurs de PDI décrits dans la littérature pouvaient inhiber l'activité thio-disulfide oxydo-réductase de la LmPDI, la capacité de ces inhibiteurs à bloquer l'activité enzymatique de la LmPDI synthétisée chez *E. coli* puis purifiée a été étudiée dans un test *in-vitro*, à différentes concentrations. Les inhibiteurs sont :

- la bacitracine
- la bacitracine de zinc
- le p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA)

- l'acide tocinoïque.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 10 et montrent que l'activité LmPDI est complètement inhibée en présence de 0.01mM de pCMBa et de 2mM de bacitracine ou de bacitracine de zinc. En revanche, l'acide tocinoïque ne semble pas avoir un effet très important sur l'activité de la LmPDI aux concentrations utilisées (concentrations qui inhibent totalement l'activité de la PDI humaine).

2- Inhibition de la croissance des parasites (*L. major*) en milieu liquide. La molécule à tester est dissoute dans le solvant approprié, selon ses propriétés physico-chimiques (solubilité dans les solutions aqueuses ou les solvant organiques). Dans tous les cas, le solvant seul est utilisé comme contrôle. Les expériences peuvent, par exemple, être réalisées sur l'isolat *L. major* GLC94. La composition du milieu de culture est détaillée ci-dessus (exemple 2, et Matériels et Méthodes). Les cultures sont incubées à 26°C et repiquées régulièrement pour maintenir les parasites en phase stationnaire de croissance. Pour certaines expériences, le stade amastigote-like du parasite est utilisé. Dans ce cas, les parasites (promastigotes) de la phase stationnaire de croissance sont centrifugés, le milieu est remplacé par le Schneider Drosophila medium ajusté à pH 5.0 et additionné de 15% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cultures sont ensuite incubées sous 5% de CO₂ à 35°C.

L'inhibition de la croissance des promastigotes de *L. major* se fait sur les parasites pris en phase de croissance exponentielle, ajustés à la concentration initiale de 10⁶ parasites/ml de milieu complet et incubés à raison de 100 µl / puits dans les plaques de cultures de 96 puits en l'absence ou en présence de différentes concentrations de la molécule à tester. Les parasites sont incubés sous 5% de CO₂ à 26°C et comptés toutes les 24h pendant 96h. Le comptage des parasites se fait sur cellule de Mallassez. Alternativement, un hémocytomètre peut être utilisé. Toutes les mesures sont faites en triplicata. La capacité inhibitrice d'une molécule

est appréciée en concentration inhibitrice qui réduit la division cellulaire par 50% par rapport au contrôle (IC50).

L'évaluation de la réduction de la viabilité des amastigotes se fait grâce à un test fluorométrique utilisant Almar Blue comme indicateur de viabilité/croissance.

Les inhibiteurs de PDI décrits dans le paragraphe (1-) ont été testés dans le but d'évaluer leurs capacités à inhiber la croissance *in-vitro* des parasites. Pour cela, différentes quantités d'inhibiteurs sont additionnés dans du RPMI contenant 2.10^6 /ml de parasites en phase exponentielle de croissance. Les parasites sont incubés à 26°C et comptés toutes les 24 heures pendant 96 heures. Le comptage des parasites est réalisé sur cellules de Mallassez. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 11 et montrent que la bacitracine, la bacitracine de zinc ou le pCMBa inhibent entièrement la croissance des leishmanies aux concentrations 5 mM et 2 mM et 0,5 mM respectivement. En revanche, le 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) aux concentrations utilisées (concentrations qui inhibent totalement l'activité de la PDI humaine) ne semble pas avoir un effet très important sur la croissance des leishmanies.

3- Evaluation de l'efficacité des inhibiteurs pré sélectionnés dans le modèle expérimental de l'infection des souris sensibles BALB/c par *L. major*. Les expériences *in vivo* vont dépendre de la toxicité et des propriétés physico-chimiques des molécules à tester. Les souris BALB/c seront infectées par 10^6 promastigotes de *L. major* obtenus durant la phase stationnaire de croissance et injectés (dans un volume de 50µl) dans le coussinet plantaire de la patte arrière droite. La mesure du diamètre des lésions se fera de façon hebdomadaire grâce à l'utilisation d'un pied à coulisse.

En tout, trois protocoles thérapeutiques seront appliqués selon les cas :

- Pour les molécules hydrophobes, qui diffusent bien, peu ou pas toxiques, le produit sera injecté à différentes concentrations et

selon différents schémas par voie intra-péritonéale. La fréquence des injections dépendra de la bio-disponibilité de la molécule ainsi que sa demi-vie. Dans tous les cas, le protocole sera arrêté au bout de 9 semaines après infection.

- 5 - Pour les molécules hydrosolubles et relativement toxiques, les injections se feront en intra-lésionnel (en général, les doses actives peuvent être divisées par 10), par au moins quatre injections au niveau de la zone indurée.
- 10 - Pour les molécules liposolubles, une pommade sera testée par application quotidienne sur la lésion expérimentale.

Globalement, et quelle que soit la voie d'injection du produit à tester, deux types de protocoles seront effectués :

- un protocole qui démarre immédiatement après injection des parasites,
- 15 - un protocole qui démarre 4 à 5 semaine après injection des parasites, à un moment où la lésion sera déjà établie.

Dans tous les cas, à la fin du protocole, les souris seront sacrifiées, une estimation de la charge parasitaire se fera au niveau du site d'injection et dans le ganglion qui draine la lésion.

20 **Exemple 6 : Infection *in vitro* de macrophages murins par *Leishmania***

Des macrophages murins de moelle osseuse (*murine bone marrow macrophages*, ou MBMM) sont obtenus à partir de moelle osseuse extrudée d'un fémur ou d'un tibia de souris BALB/c femelles. Les MBMM sont cultivées en plaques multi-chambres à $1,5 \times 10^3$ cellules par puits
25 dans 500 μ l de milieu complet. Pour stimuler la croissance et la maturation des MBMM, le milieu de culture est supplémenté avec 20% de milieu



conditionné avec des fibroblastes L-929, comme source de facteur stimulateur de colonie de macrophages (*macrophage colony stimulating factor*, ou *MCSF*). Après 6 jours de culture à 37°C et 5% CO₂, le milieu est enlevé, les MBMM sont lavées, et du milieu RPMI frais avec 10% de sérum de veau foetal, mais ne comportant pas de milieu conditionné par des fibroblastes L-929, est ajouté. Des amastigotes intra-lésionnels sont purifiés à partir de lésions non-ulcérées, par centrifugation différentielle, et comptés en utilisant le colorant viral bleu trypan. Ces parasites sont utilisés pour infecter les MBMM à un ratio final de quatre parasites par macrophage. Deux heures après l'addition des parasites, les macrophages sont rincés cinq fois avec du PBS pour éliminer les amastigotes non phagocytés. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C dans 95% d'air et 5% de CO₂. Les expériences sont effectuées à différents points dans le temps : 30 minutes et 2, 24 et 72 heures. Aux temps indiqués, les puits sont rincés avec du PBS, les couvercles sont enlevés, et les macrophages infectés sont fixés à l'éthanol pendant 1 heure à température ambiante. Les plaques sont ensuite lavées et colorées au Giemsa pour suivre l'infection.

L'énumération des macrophages infectés est réalisée au centre de chaque puits, où les cellules sont bien étalées et où les parasites peuvent être facilement énumérés. A ce niveau de la plaque, le ratio parasite/macrophage peut être supérieur à 4.

BIBLIOGRAPHIE

- 5 Beverley, S. M. and S. J. Turco (1998). "Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*." Trends Microbiol **6**(1): 35-40.
- Chakrabarty, R., S. Mukherjee, et al. (1996). "Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG)." J Parasitol **82**(4): 632-5.
- 10 Cotrim, P. C., L. K. Garrity, et al. (1999). "Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection." J Biol Chem **274**(53): 37723-30.
- 15 De, T. and S. Roy (1999). "Infectivity and attenuation of *Leishmania donovani* promastigotes: association of galactosyl transferase with loss of parasite virulence." J Parasitol **85**(1): 54-9.
- Descoteaux, A., Y. Luo, et al. (1995). "A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*." Science **269**(5232): 1869-72.
- 20 Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-8.
- 25 Desjardins, M. and A. Descoteaux (1998). "Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages." Res Immunol **149**(7-8): 689-92.

- Dumas, C., M. Ouellette, et al. (1997). "Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages." Embo J **16**(10): 2590-8.
- 5 Ferrari, D. M. and H. D. Soling (1999). "The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds." Biochem J **339**(Pt 1): 1-10.
- Frand, A. R., J. W. Cuozzo, et al. (2000). "Pathways for protein disulphide bond formation." Trends Cell Biol **10**(5): 203-10.
- 10 Garami, A. and T. Ilg (2001). "The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugate synthesis and virulence." J Biol Chem **276**(9): 6566-75.
- Heard, P. L., C. S. Lewis, et al. (1996). "*Leishmania mexicana amazonensis*: differential display analysis and cloning of mRNAs from attenuated and infective forms." J Eukaryot Microbiol **43**(5): 409-15.
- 15 Hubel, A., S. Krobitsch, et al. (1997). "*Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite." Mol Cell Biol **17**(10): 5987-95.
- Hultgren, S. J., S. Abraham, et al. (1993). "Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition." Cell **73**(5): 887-901.
- 20 Ilg, T. (2000). "Proteophosphoglycans of *Leishmania*." Parasitol Today **16**(11): 489-97.
- 25 Ilg, T., M. Demar, et al. (2001). "Phosphoglycan Repeat-deficient *Leishmania mexicana* Parasites Remain Infectious to Macrophages and Mice." J Biol Chem **276**(7): 4988-97.

Kebaïer, C., H. Louzir, et al. (2001). "Heterogeneity of wild *Leishmania* major isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response." Infection and Immunity **69**(8).

5 Khalil, E. A., A. M. El Hassan, et al. (2000). "Autoclaved *Leishmania* major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan." Lancet **356**(9241): 1565-9.

Liang, P., D. Bauer, et al. (1995). "Analysis of altered gene expression by differential display." Methods Enzymol **254**: 304-21.

10 Liang, P. and A. B. Pardee (1992). "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction." Science **257**(5072): 967-71.

15 Lira, R., S. Sundar, et al. (1999). "Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*." J Infect Dis **180**(2): 564-7.

Louzir, H., P. C. Melby, et al. (1998). "Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* major." J Infect Dis **177**(6): 1687-95.

20 Lyles, M. M. and H. F. Gilbert (1991). "Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer." Biochemistry **30**(3): 613-9.

25 Lyles, M. M. and H. F. Gilbert (1991). "Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: pre-steady-state kinetics and the utilization of the oxidizing equivalents of the isomerase." Biochemistry **30**(3): 619-25.

- Martin, J. L. (1995). "Thioredoxin--a fold for all reasons." Structure **3**(3): 245-50.
- McKerrow, J. H., J. C. Engel, et al. (1999). "Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections." Bioorg Med Chem **7**(4): 639-44.
- Mottram, J. C., D. R. Brooks, et al. (1998). "Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host- parasite interactions." Curr Opin Microbiol **1**(4): 455-60.
- Mottram, J. C., A. E. Souza, et al. (1996). "Evidence from disruption of the *lmc pb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6008-13.
- Mukhopadhyay, S., P. Sen, et al. (1998). "Reduced expression of lipophosphoglycan (LPG) and kinetoplastid membrane protein (KMP)-11 in *Leishmania donovani* promastigotes in axenic culture." J Parasitol **84**(3): 644-7.
- Noiva, R. (1999). "Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 481-93.
- Ostermeier, M., K. De Sutter, et al. (1996). "Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* *dsbA* mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds." J Biol Chem **271**(18): 10616-22.
- Paramchuk, W. J., S. O. Ismail, et al. (1997). "Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis." Mol Biochem Parasitol **90**(1): 203-21.

- Peek, J. A. and R. K. Taylor (1992). "Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6210-4.
- 5 Perez-Victoria, J. M., F. J. Perez-Victoria, et al. (2001). "High-affinity binding of silybin derivatives to the nucleotide-binding domain of a *Leishmania tropica* P-glycoprotein-like transporter and chemosensitization of a multidrug-resistant parasite to daunomycin." Antimicrob Agents Chemother **45**(2): 439-46.
- 10 Ryan, K. A., L. A. Garraway, et al. (1993). "Isolation of virulence genes directing surface glycosyl- phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8609-13.
- 15 Sacks, D. L., G. Modi, et al. (2000). "The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 406-11.
- Selzer, P. M., X. Chen, et al. (1997). "*Leishmania major*: molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors." Exp Parasitol **87**(3): 212-21.
- 20 Sharifi, I., A. R. FeKri, et al. (1998). "Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran." Lancet **351**(9115): 1540-3.
- 25 Spath, G. F., L. Epstein, et al. (2000). "Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9258-63.
- Streit, J. A., T. J. Recker, et al. (2001). "Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous

infection with virulent but not avirulent organisms." J Immunol **166**(3): 1921-9.

Titus, R. G., F. J. Gueiros-Filho, et al. (1995). "Development of a safe live Leishmania vaccine line by gene replacement." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10267-71.

Wang, Y., E. S. Bjes, et al. (2000). "Molecular aspects of complement-mediated bacterial killing. Periplasmic conversion of C9 from a protoxin to a toxin." J Biol Chem **275**(7): 4687-92.

Wiese, M. (1998). "A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of Leishmania mexicana is essential for parasite survival in the infected host." Embo J **17**(9): 2619-28.

Yu, J. (1998). "Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, affects the intracellular survival and virulence of Shigella flexneri." Infect Immun **66**(8): 3909-17.

Yu, J., B. Edwards-Jones, et al. (2000). "Key role for DsbA in cell-to-cell spread of Shigella flexneri, permitting secretion of Ipa proteins into interepithelial protrusions." Infect Immun **68**(11): 6449-56.

Yu, J. and J. S. Kroll (1999). "DsbA: a protein-folding catalyst contributing to bacterial virulence." Microbes Infect **1**(14): 1221-8.

Yu, J., H. Webb, et al. (1992). "A homologue of the Escherichia coli DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in Vibrio cholerae." Mol Microbiol **6**(14): 1949-58.

Zhang, H. Z. and M. S. Donnenberg (1996). "DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic escherichia coli." Mol Microbiol **21**(4): 787-97.

Zhang, W. W. and G. Matlashewski (1997). "Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote- specific protein, A2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8807-11.

REVENDECATIONS

1. Protéine impliquée dans la virulence de *Leishmania*, comportant au moins un site (Cys-Gly-His-Cys) identique au site actif potentiel d'une protéine de la famille des protéines disulfides isomérases (PDI).
5
2. Protéine de *Leishmania* impliquée dans la virulence du parasite, comportant au moins un site (Cys-Gly-His-Cys) identique au site actif potentiel d'une protéine de la famille des protéines disulfides isomérases (PDI).
- 10 3. Protéine selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine LmPDI de *Leishmania major*, de séquence SEQ ID No: 2, ou d'un variant fonctionnel de la LmPDI, présentant au moins 40%, et de préférence au moins 80% d'identité avec la LmPDI.
- 15 4. Polypeptide recombinant comportant au moins un fragment de plus de 10 acides aminés d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ledit polypeptide recombinant étant susceptible de déclencher une réaction immunologique contre un épitope de la LmPDI, lorsqu'il est administré à un hôte, humain ou animal.
- 20 5. Polypeptide recombinant selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit de la protéine LmPDI-(His)₆ de séquence SEQ ID No :3.
- 25 6. Protéine de fusion comportant un polypeptide recombinant selon la revendication 4, fusionné à un autre fragment polypeptidique, ladite protéine de fusion étant susceptible de déclencher une réaction immunologique contre un épitope de la LmPDI, lorsqu'elle est administrée à un hôte, humain ou animal.

7. Séquence d'acide nucléique recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.
8. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence codante correspondant aux
5 nucléotides 241 à 1674 de la séquence SEQ ID No : 1, ou un fragment de cette séquence de taille supérieure ou égale à 30 nucléotides, de préférence supérieure ou égale à 100 nucléotides.
9. Vecteur d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ou 8.
10. Vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
10 plasmide, d'un cosmide, d'un phage, ou d'un virus.
11. Cellule en culture comprenant un vecteur selon la revendication 9 ou 10.
12. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il s'agit de la
15 souche bactérienne LmPDI-XL₁, déposée à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM) le 31/01/2001 sous le numéro I-2621.
13. Sonde d'acide nucléique caractérisée en ce qu'elle s'hybride
20 spécifiquement, en conditions de forte stringence, avec la séquence nucléique correspondant aux nucléotides 241 à 1674 de la séquence SEQ ID No : 1, permettant de déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant pour la LmPDI, dans un échantillon biologique.
14. Amorce nucléotidique caractérisée en ce qu'elle permet
25 l'amplification spécifique d'au moins une partie de la séquence de SEQ ID No : 1, à partir de cellules infectées par *Leishmania*,

permettant ainsi de déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant la LmPDI, dans un échantillon biologique.

15. Anticorps purifié, reconnaissant spécifiquement la LmPDI.
16. Composition immunogène, comportant une protéine selon la revendication 1, 2, 3 ou 6 et/ou un polypeptide recombinant selon la revendication 4 ou 5, et/ou une séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ou 8, et/ou un vecteur selon la revendication 9 ou 10, et/ou une cellule selon la revendication 11, ladite composition immunogène étant capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec un parasite *Leishmania*.
17. Composition immunogène selon la revendication 16, capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec *Leishmania major*.
18. Composition immunogène selon la revendication 16 ou 17, de formulation pharmaceutiquement acceptable pour être administrée à un hôte humain ou animal.
19. Composition immunogène selon les revendications 16 à 18, capable d'induire une réponse immunitaire de type Th1 lorsqu'elle est administrée à un hôte, humain ou animal.
20. Composition vaccinnante comportant une protéine selon la revendication 1, 2, 3 ou 6, et/ou un polypeptide recombinant selon la revendication 4 ou 5, et/ou une séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ou 8, et/ou un vecteur selon la revendication 9 ou 10, et/ou une cellule selon la revendication 11, ladite composition vaccinnante étant destinée à protéger un hôte, humain ou animal, contre la leishmaniose.

21. Composition vaccinnante selon la revendication 20, de formulation pharmaceutiquement acceptable pour être administrée à une hôte humain ou animal.
22. Composition immunogène et/ou vaccinnante selon l'une quelconque des revendications 16 à 21, comportant en outre un antigène étranger à *Leishmania* et/ou une séquence d'acide nucléique codant pour un antigène étranger à *Leishmania*.
23. Procédé de criblage de molécules susceptibles d'inhiber la croissance de *Leishmania major*, comportant une étape d'évaluation de la capacité desdites molécules à inhiber l'activité de la LmPDI.
24. Procédé de criblage selon la revendication 23, dans lequel l'étape d'évaluation de la capacité d'une molécule à inhiber l'activité de la LmPDI est effectuée dans un test de réactivation de la RNase A réduite et dénaturée, comportant les étapes suivantes :
- incubation de la RNase A réduite et dénaturée en présence de LmPDI, dans des conditions permettant sa réactivation,
 - incubation de la RNase A réduite et dénaturée dans des conditions identiques à celles permettant sa réactivation par la LmPDI, en ajoutant la molécule à tester,
 - comparaison des résultats obtenus en absence et en présence de la molécule à tester, un défaut de réactivation de la RNase A en présence de la molécule testée révélant que cette molécule possède une activité inhibitrice de la LmPDI.
25. Procédé de criblage selon les revendications 23 et 24, comportant en outre un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* en milieu liquide et, le cas échéant, un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* dans un modèle murin de leishmaniose expérimentale.

21. Composition vaccinante selon la revendication 20, de formulation pharmaceutiquement acceptable pour être administrée à une hôte humain ou animal.
22. Composition immunogène et/ou vaccinante selon l'une quelconque des revendications 16 à 21, comportant en outre un antigène étranger à *Leishmania* et/ou une séquence d'acide nucléique codant pour un antigène étranger à *Leishmania*.
23. Procédé de criblage de molécules susceptibles d'inhiber la croissance de *Leishmania major*, comportant une étape d'évaluation de la capacité desdites molécules à inhiber l'activité de la LmPDI.
24. Procédé de criblage selon la revendication 23, dans lequel l'étape d'évaluation de la capacité d'une molécule à inhiber l'activité de la LmPDI est effectuée dans un test de réactivation de la RNase A réduite et dénaturée, comportant les étapes suivantes :
- incubation de la RNase A réduite et dénaturée en présence de LmPDI, dans des conditions permettant sa réactivation,
 - incubation de la RNase A réduite et dénaturée dans des conditions identiques à celles permettant sa réactivation par la LmPDI, en ajoutant la molécule à tester,
 - comparaison des résultats obtenus en absence et en présence de la molécule à tester, un défaut de réactivation de la RNase A en présence de la molécule testée révélant que cette molécule possède une activité inhibitrice de la LmPDI.
25. Procédé de criblage selon les revendications 23 et 24, comportant en outre un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* en milieu liquide et, le cas échéant, un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* dans un modèle murin de leishmaniose expérimentale.
26. Utilisation d'un ou plusieurs inhibiteurs des Protéines Disulfides Isomérases (PDI), pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prophylaxie, à l'atténuation, ou au traitement d'une infection par *Leishmania*

26. Molécule susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisée par sa capacité à inhiber la croissance de *Leishmania major*.
- 5 27. Utilisation d'un ou plusieurs inhibiteurs des Protéines Disulfides Isomérases (PDI), pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prophylaxie, à l'atténuation, ou au traitement d'une infection par *Leishmania*.
- 10 28. Utilisation selon la revendication 27, dans laquelle un inhibiteur des PDI est un anticorps anti-PDI ou anti-LmPDI, la bacitracine, l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), l'acide p-chloromercuribenzenesulfonique (pCMBS), ou l'acide tocinoïque.
29. Utilisation selon la revendication 27 ou 28, pour la préparation d'une composition administrable à un hôte humain ou animal, par voie topique, orale ou parentérale.
- 15 30. Composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection par *Leishmania*, comportant un anticorps selon la revendication 15.
31. Composition selon la revendication 30, appropriée à une administration topique, orale ou parentérale.
- 20 32. Méthode de diagnostic *in vitro* d'une infection par un parasite responsable de la Leishmaniose, caractérisée en ce qu'elle comprend :
- la mise en contact d'au moins un anticorps selon la revendication 15 avec un prélèvement biologique d'un sujet partiellement infecté par un parasite responsable de la Leishmaniose,

25 dans des conditions permettant la formation d'un complexe immun entre ledit anticorps et les protéines antigéniques contenues dans le prélèvement,

 - la détection dudit complexe.

27. Utilisation selon la revendication 26, dans laquelle un inhibiteur des PDI est un anticorps anti-PDI ou anti-LmPDI, la bacitracine, l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), l'acide p-chloromercuribenzenesulfonique (pCMBS), ou l'acide tocinoïque.
- 5 28. Utilisation selon la revendication 26 ou 27, pour la préparation d'une composition administrable à un hôte humain ou animal, par voie topique, orale ou parentérale.
29. Composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection par *Leishmania*, comportant un anticorps selon la revendication 15.
- 10 30. Composition selon la revendication 29, appropriée à une administration topique, orale ou parentérale.
31. Méthode de diagnostic *in vitro* d'une infection par un parasite responsable de la Leishmaniose, caractérisée en ce qu'elle comprend :
 - la mise en contact d'au moins un anticorps selon la revendication 15
 - 15 avec un prélèvement biologique d'un sujet partiellement infecté par un parasite responsable de la Leishmaniose, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immun entre ledit anticorps et les protéines antigéniques contenues dans le prélèvement,
 - la détection dudit complexe.
- 20 32. Trousse de diagnostic par la mise en œuvre de la méthode selon la revendication 31 caractérisée en ce qu'elle comprend :
 - au moins un anticorps selon la revendication 15,
 - un milieu approprié à la formation d'un complexe immun avec ledit anticorps,
 - 25 - des réactifs permettant la détection des complexes éventuellement formés,
 - le cas échéant, des échantillons témoins.

33. Trousse de diagnostic pur la mise en œuvre de la méthode selon la revendication 32 caractérisée en ce q'elle comprend :

- au moins un anticorps selon la revendication 15,
- un milieu approprié à la formation d'un complexe immun avec ledit anticorps,
- des réactifs permettant la détection des complexes éventuellement formés,
- le cas échéant, des échantillons témoins.

1/13

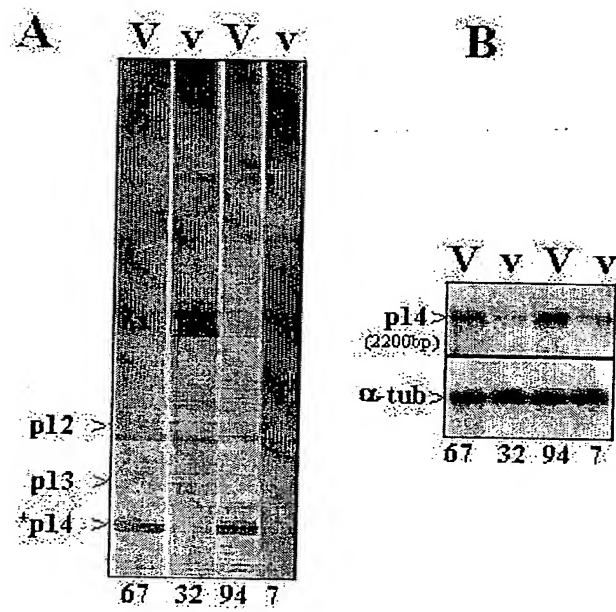


Figure 1

```

99caccagcggcaccagagtttctgtactttattgtctttctctattctacccacacttgccctctctgcegt 72
ctctgtgcctgtgcggggcgcaacgtgcctttctctccgtattgccagctgtgagctgctgctactggc 144
aacgtgtacgccattcccggtttcttgattctggtgcagtgctcagctctacccctattgtattgataccgtt 216
ttccttttgcgttttgcaaaagaaaa.ATG CAG CGC TCA TTC CTT GTT TTT GTT CTG TGC GCC 276
M Q R S P L V F V L C A 12
CTT CTC TTC TGC GTC GCG TCC GCA GAG GTG CAG GTG GCC ACT AAG GAC AAC TTT 330
L L F C V A S A E V Q V A T K D N F 30
GAC AAG GTC GTA ATC GGG GAT CTC ACG TTG GTC AAG TTT TAT GCT CCG TGG TGC 384
D K V V I G D L T L V K F Y A P W C 48
GGC CAC TGC AAG ACA CTC GCC CCG GAG TTT GTA AAG GCC GCT GAC ATG CTG GCC 438
G H C K T L A P E F V K A A D M L A 66
GGC ATC GCG ACC CTT GCA GAG GTC GAT TGC ACC AAA GAA GAG AGC CTT GCT GAG 492
G I A T L A E V D C T K E E S L A E 84
AAG TAC GAA ATC AAG GGG TTC CCC ACG CTG TAC ATC TTC CGT AAC GGT GAG AAA 546
K Y E I K G F P T L Y I F R N G E K 102
GTG AAG ATC TAC GAT GAT CCC CGC ACT GCC GCC GGC ATC GCG TCG TAC ATG AAG 600
V K I Y D G P R T A A G I A S Y M K 120
GCG CAT GTC GGT CCA TCG ATG AAG GCC ATC TCA ACG GCT GAA GAG CTG GAG GAG 654
A H V G P S M K A I S T A E E L E E 138
CTC AAG AAG GAG ACT TTC CCG GTG TGC GTG GTG AAG ACA GCG AGC ACC GAC TCG 708
L K K E T F P V C V V K T A S T D S 156
GAG ATG GCG TCG ATG ATA ACC AAG GTG GCG GAC TCT CTC CGC TCG CAG ATG AAC 762
E M A S M I T K V A D S L R S Q M N 174
TTT GTG CTC GTG ACG GAT GCG GCC ATC TCT CCG AAT GAT GCC ATG GAG TCG GTT 816
F V L V T D A A I S P N D A M E S V 192
ACG GTG TAT CGC AAG AAT GCG GAG CGC GAG GCG TAC ACC GGC GCT ACA CCA ATG 870
T V Y R K N A E R E A Y T G A T P M 210
ACG GCA GAG TCG GTG AAG AGC TTT CTC ACG AGT GCT GTG TTG GAC TAC TTT GGC 924
T A E S V K S F L T S A V L D Y F G 228
GAG CTC GGC CAG GAG AGC TTT CAG AAG TAC ATG GAA GCG AAC AAG GAT AAA CCT 978
E L G Q E S F Q K Y M E A N K D K P 246
CTT GGG TGG GTG TTC ATC GAC AAG AAC ACG GAT TCT GCG TTG AAG GGG TCA CTT 1032
L G W V F I D K N T D S A L K G S L 264
GTG GCG GTG GCG GAG AAG TAC CGC TCG CAG GTG TTG CTA ACC TAC ATT GAC GGC 1086
V A V A E K Y R S Q V L L T Y I D G 282
GAT CAG TAC CGC CCC GTC TCG CGC CAG CTG GGC ATT CCT GAG GAT GCG AAG TTC 1140
D Q Y R P V S R Q L G I P E D A K F 300
CCG GCG TTT GTG GTC GAT TTC GAG CGC CGC CAT CAC GTG ATG GGG ACG GAC ACC 1194
P A F V V D F E R R H H V M G T D T 318
CCA GTC ACC TCC GAG TCT GTC GCT GCG TTT GTG GAG AAG TAT GTC AAG GGC GAG 1248
P V T S E S V A A F V E K Y V K G E 336
ACG AAG CAG ACC GTG ATG TCC GAC GCG ATT CCC GCT AAG GAG ACG GTG AAC GGC 1302
T K Q T V M S D A I P A K E T V N G 354
CTC ACA ACG GTG GTG GGT CAG ACT TTT GCG AAG TAC ACG GAC GGC ACA CAA AAC 1356
L T T V V G Q T F A K Y T D G T Q N 372
GTG ATG CTG CTC TTC TAC GCG CCG TGG TGC GGA CAC TGC AAG AAG CTG CAC CCC 1410
V M L L F Y A P W C G H C K K L H P 390
GTC TAC GAT AAA GTA GCC AAG AGC TTC GAG TCT GAG AAT GTG ATC ATT GCG AAG 1464
V Y D K V A K S F E S E N V I I A K 408
ATG GAT GCC ACG ACG AAC GAC TTT GAC CGC GAG AAG TTT GAG GTG TCT GGA TTT 1518
M D A T T N D F D R E K F E V S G F 426
CCA ACG ATT TAC TTC ATC CCA GCC GGC AAG CCG CCA ATC GTG TAC GAG GGT GGC 1572
P T I Y F I P A G K P P I V Y E G G 444
CGC ACC GCA GAC GAA ATC CAG GTG TTT GTG AAG TCT CAC CTG ACC GCC TCC GCC 1626
R T A D E I Q V F V K S H L T A S A 462
GCT CCA TCT GGC GGC CCT TCC GGC AAC AGC GAA GAG GAA GAT TTG TAG gactgca 1681
A P S G G P S G N S E E E D L * 478
agggatgtggcggtttataggctgccctgccttcccttgcgtgtttctatgacggattaggtttttttgtta 1753
tatgtgggggtggcgaagagagtgccagggtccttctttatctcttgcgttttctttttttgttccct 1825
gtgttgacgtctatgcgtgcgtgctgcagactctttgtcaacctgcgtcctatctagtagcatcgatgt 1897
gaaaagaagagtagagggaggtaacgtagcggtgcgtgcgttccgtttttcatgggcgcaatttcgagaagga 1969
aaatcggaatggacagatagcgaaattagcgcaacgacaaggtcggtgcgtctttctctatcggtcatta 2041
aatttctgggctttgtaacaatgaaagaagtcacacacaaaaaaaaaaaaaaaaa 2094

```

Figure 2

3 / 13

Figure 3 A

```

L. major      1  -----MORSFLVFVLCALFCVSAEVO-----VATKDNFD
T. brucei     1  -----MRAIFLVALALATMRESTAESLK-----LTKEN-FN
H. jecorina   1  -----MQQKRITAAALVAALAAVSAESE-----VKSLTKDFTN
C. elegans    1  -----MIIVQAATVASFLAFASAGGA-----VLEYTDGNFD
C. reinhard   1  MNRWNLLALTLGLLVAAPETKHQFAHASDEYEDDEEDDAPAAPKDDVDVTVVTVKNWD
D. melano     1  -----MKFLICALFLAASYVAASAEAEVKVE-----GVLVATVDNFK
C. parvum     1  -----MIGIRSLVSAALFGSCLSKVVLGDEAHFIS-----EHITSETSSNFE
H. sapiens    1  -----MERRALLCLAVAALVRADAPPEED-----HVLVERKSNFA

L. major      32  KVVIG-DLTLVKFYAPWCGHCKTLAPEFVKAADMLAGIAT---LAEVDCITKEESLAEKYE
T. brucei     31  ETIAKSEIFLVKFYVDTCGYCQMLAPEWEKAANETIDNALMG---FVDCHSOPPLAANES
H. jecorina   34  DFINSNDLVLAESFAPWCGHCKALAPEYEBEATTLKDKS---IKLAKVDCVEEADLCKEHG
C. elegans    32  DLIQTHDLALVKFYAPWCGHCKRIAPEYERAPKLASNDPPVALVKVDCITTEKTVCDKRG
C. reinhard   61  ETVKKSFKALVEFYAPWCGHCKTLKPEYAKAATALKAAAPDALAKVDATQEESSLAQKRG
D. melano     39  QLIADNEFVLVEFYAPWCGHCKALAPEYAKAAQOLAEEKESPLKAKVDATVEGELAEQYA
C. parvum     45  EFKSKSEHYIVTTFAPWCGHCTALEPEFKATCAETSKLSPPVCCSVDATENMELAQOYG
H. sapiens    36  EATAAHKYLVLVEFYAPWCGHCKALAPEYAKAAGKLAESSEILAKVDATTEESDLAQOYG

L. major      88  IKGPTLYIFRNGE--KVKIYDGPRTAAGIASYMKAHVGPMSKAISTABEETEKKETFP
T. brucei     88  IGYPTLILFRNGK--EAEHYCGARTKDDITKYIKANVGPAVTPASNAEEVTRAKEHDV
H. jecorina   92  VEGYPTLKVFGRGLD--KVAPYTCPRKADGITSYVVKOS-LPAVSALTKEETEDFKTADRV
C. elegans    92  VKGPTLTKIFRNG--VPAQDYDGPADGIVKEMRGSGSPSSKEEKVVAEFKFKTGGDEN
C. reinhard   121 VQGYPTLKWEVVG--ELASDYNGPRDADGIVGVKKKTGPPAVTVEDAKLKSLEADAEV
D. melano     99  VEGYPTLKFFRSG--SPVEYSGGRQAADITAAVTKKTGPPAKDITSVADAEQFLKQNET
C. parvum     105 VSGYPTLKFFRSGID--SVQNYSGARSKDAFIKYTKKLTGPAVQVAESSEEAITKTFASSSS
H. sapiens    96  VRGYPTLKFFRNGDTASPKGYTAGREADDIVNKKKRTGPAATTEPDGAAAESVESSEV

L. major      146 VCVVKTASTESSEMAMITKVADSRSONFVLVTDAAISPNDAMESVT----VYRKNAF
T. brucei     146 VCVGLTANNSTSLSTTLAEAAQSFRVSKFFEAEPKLFPDEKPEITIVVYR----KG
H. jecorina   149 VVAYIAADEKASNETITALENELRDTYLFGGVNDAAVAAEAGVKFP---S-EVLKMSFD
C. elegans    150 VVIGFESESKLKDSYLKVADTERDRFSFHTSNKDTIKKAGYSDDVVVFVPKLLNKED
C. reinhard   179 VVVGFFKALEGEIYDTFKSYAAKTEDVVFQITSAADVAKAAGLDAVDTVSV-VKNEAGED
D. melano     156 AVIGCFKDLSEEAFTTKVANALDSFVSVSNADVTAKYEAKDNG----VVLKPFED
C. parvum     163 AVVGRFTSKDSAEYAVFEKVASGHRHNYAFIAFFQEGEQKLEVLHK-----D
H. sapiens    156 AVIGCFKDVESDSAKOFLQAAEAIDDIPIFCITNSNDVFSKYQLDKDG----VVLKPKFD

L. major      201 REAYTGATPMTAESVRSFLTSAVLDFYFGLGQSEFQKYMEANKDKPLGWVFDKN--TDS
T. brucei     198 GEKEVYDCPMVEVKLTFFLOHSRVAFGGELTPENYQYYSVIKRP--VGWAMVKPNETASI
H. jecorina   205 EGKNVESEKFDAAETRNFAQVAATPLVGEVGPETYAGYMSACIPLAYIFAETAE---RE
C. elegans    210 TNEFKYDCNYDTOKKYNFLVHETVGFAGIRTOGNLFQEQKPIVIVYINVVDYVKDPKGSN
C. reinhard   238 RATAVLATDIDTDSLTAFFVKSEKMPPTIEFNQKNSDKIFNSGINKQLILWTTADLAKADA
D. melano     211 EKKSVEEGELNEENLKKFAQVQSEPLIVDFNHESASKIFG-GSIKSHLLFFVSRGGHIE
C. parvum     211 BEPVSLPMPKTVEELEAKISIMNVPLFSALSAENYSLYMS--RE--GYTPGSVLTTRTSP
H. sapiens    211 EGRNNEEGEVTKENLLDFIKHNQPLVIEFTTECTAPKIFG-GEIKTHILLFEPKSVSDYD

L. major      259 AKGSLVAVAEKYRSQVLLTYIDGPOYR--PVSRLGPEDAKFPAPVVDFFERRI-FVMG
T. brucei     256 BKESLTEVGKKMRSSEHVLWNISKHP--VWRDFGVPEDAKYPAFLAIHWGAN-YLFS
H. jecorina   262 NLAKILKPVAEKYKGLNFATIDAKNEG--SHAGNINIKTKFEAFATHDTEKNLKPFDF
C. elegans    270 YWRNRVLKVAQNYKRYQVAFVSNKEEESSEIETNGLGERKDSDKPTIVAILTNECK---YP
C. reinhard   298 EHMIVFREASKKEKGLVFEVTVNNEGDGADPVTNFFGLKATSEVILGFFMEKNK-KFRM
D. melano     270 KYVDPLKETAKKYRDDTLFVTTISSDEEDHTRIEFFFGNKEEVPTIRIKKEEDMAKYKP
C. parvum     267 SMLQTLERLQLITEKSMPLFSDDTEQEG-SHATQHLLKFKPGLVQSNNPSPIS-YYMG
H. sapiens    270 GKLSNFKTAASEKGLLFLIFDSEHTDNQRILEFFGLKKEECPAVRETTSEEMTKYKP

```

Figure 3 B

L. major 316 TDTPVTSESVAAFVEKVKGETKQFVMSALPAKETVNGITTVVCGTFAKYTDG-TQNVV
T. brucei 312 TAEVVTRESLEKFTLEFAAGRVEPTTKSLPVPEVETVDGKTTTVAKTMQKHLTS-GKDM
H. jecorina 320 QSKEETEKDIAAFVDCFSGKLEASTKSEPIPETQ-EGPVTVMVAHSYKDIIVLDDKKDVL
C. elegans 327 MDQEFSSVENLQQFVDEVLAGNAEPYMKSEPIPEQ--GDVKVAVGKNEKELTMDADKDVL
C. reinhard 357 EG-EFTAGNVAKFAESVWEGTAGAVEKSEAIPEDPYEDGVYKIVGKTVESVVIDETKDVL
D. melano 330 ESDELSAETHAEFEEKFLDGKLEKQHLSEELPEDWDKNPVKIVSSNFESVALDKSKSVL
C. parvum 325 PAKFDSVEPLKEFMKQVSEGHLSIKSEPIPAEQ-SGPVTVMVGKTFEELVFRSDKDVL
H. sapiens 330 ESEEDTAERTTEFCHRFLEGKIKPHCMSEELPEDWDKQPVKIVVGKNFEDVAFDEKKNVF

L. major 375 LIFYAPWCGHCKKLHPMYDKVAKSES----ENVIIAKMDATINDFDREKFEVSGFPTIY
T. brucei 371 ILFEAPWCGHCKNFAPTEDKIAKEEDAT---DLIVAEEDATANYVNSSTFTVTAFPTVF
H. jecorina 379 IEFYTPWCGHCKLAPKYDELASLVAKSDFKDKVIAKV DATANDVE---DEIQGFPTIK
C. elegans 385 IEFYAPWCGHCKSLAPKYELAEKLNK---EDVIIAKMDATANDVPPM-FEVRGFPTIF
C. reinhard 416 IEFYAPWCGHCKLEPIYKKLAKRERK---VDSVIIAKMDSTANEHPE--IEVKGFPITL
D. melano 390 IEFYAPWCGHCKQLAPIYDOLAEKYD---NEDVIIAKMDSTANELES--IKISSFPTIK
C. parvum 384 IEFYAPWCGHCKNLEPIYNOLGEEYKD---NDKVIAKINGPONDIPYEGFSPPAFPTIL
H. sapiens 390 IEFYAPWCGHCKQLAPIWDKLGETYKD---HENIVIAKMDSTANEVEA--VKVHSFPTIK

L. major 431 FIPA--GKPPPIVYEG-GRTADEIQVFVKSHLT-----ASAAPSGGPGSGNS
T. brucei 427 FVPN--GGKPVVFEG-ERSFENVYEFVRKHVTTTFKVSEKPANVTEEEKKSEENKSSKSNE
H. jecorina 436 LYPAGDKKNPVYSG-ARTVEDFIEFIENGKYKAGVEIPAEPTEEAFASESKASSEAKA
C. elegans 440 WLPKNAKSNPIPYNG-GREVKDFVSFISKHS-----T--DGLKGFSDGKKK
C. reinhard 471 FYPAGSDRTPIVEEGGDRSLKSLTKFIKINAKIPYELP---KKGSEGDGTSDDKPKPAS
D. melano 445 YFRK-EDNKVIDENL-ERTLEDVFVKELDANG-----EVADESEPVETEETEEAP
C. parvum 441 FVKA-GTRTPIPYDG-KRTVEAFKEFISEHS-----SFPOE-KE
H. sapiens 445 FFPASADRTVIDYNG-ERTLDGFKKFEESGQDGAGDDDDLEDLEAEPEPMEEDDDOKA

L. major 473 -----EEDL
T. brucei 484 SNDSNESNVDRKODL
H. jecorina 495 SEET-----HDEL
C. elegans 484 K-----KDEL
C. reinhard 528 D-----KDEL
D. melano 492 K-----KDEL
C. parvum 477 S-----KDEL
H. sapiens 504 V-----KDEL

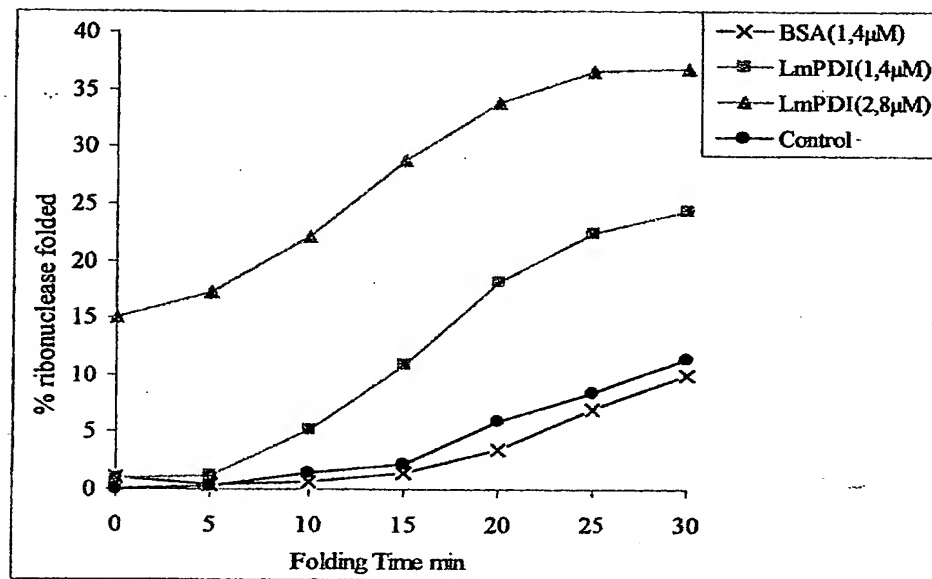


FIGURE 4

6/13

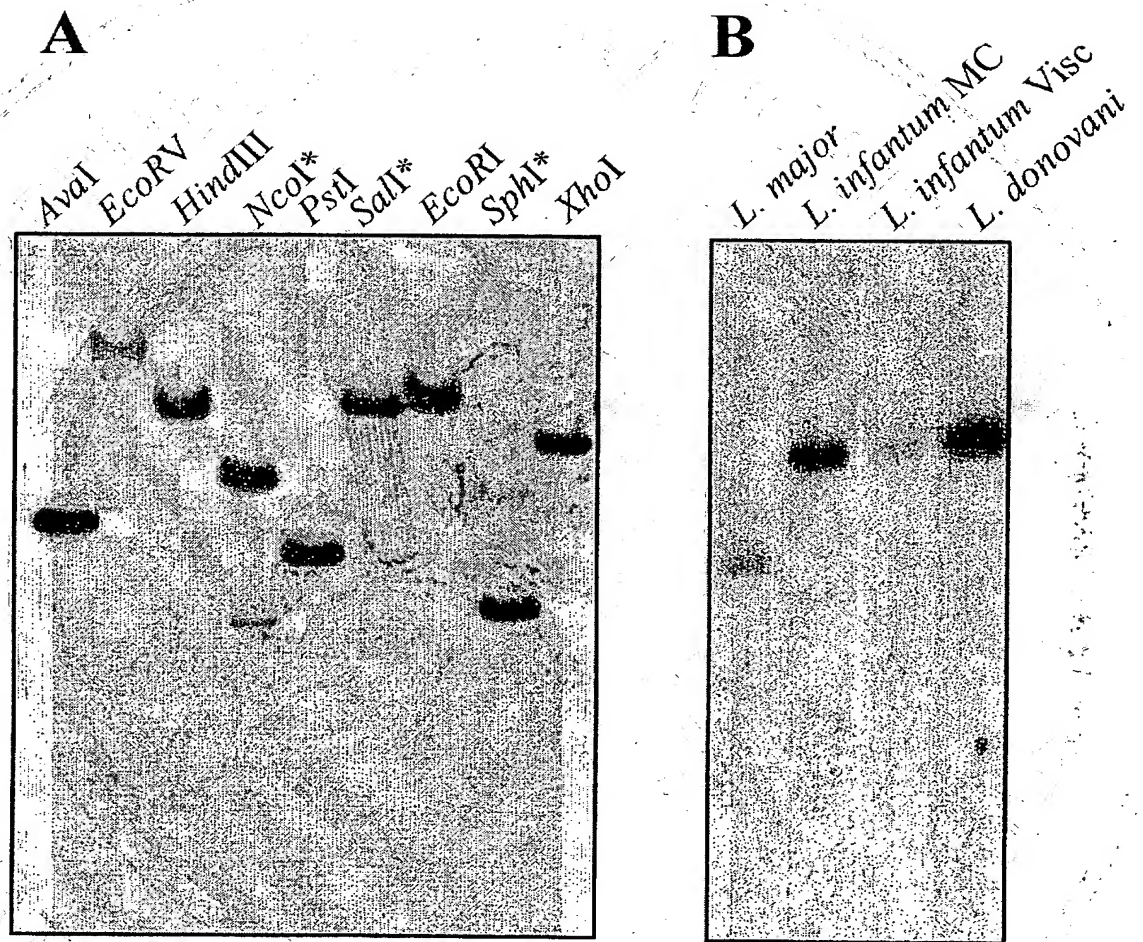


Figure 5



7/13

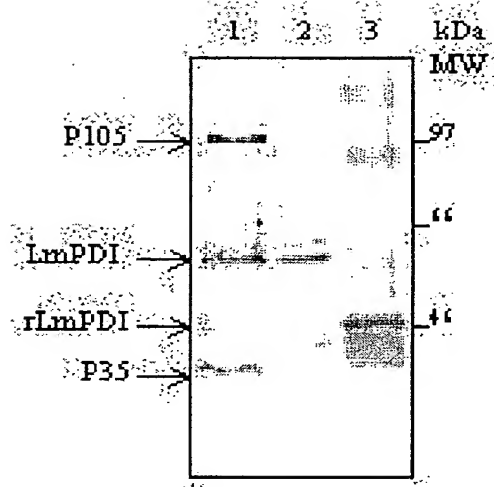


Figure 6

8/13

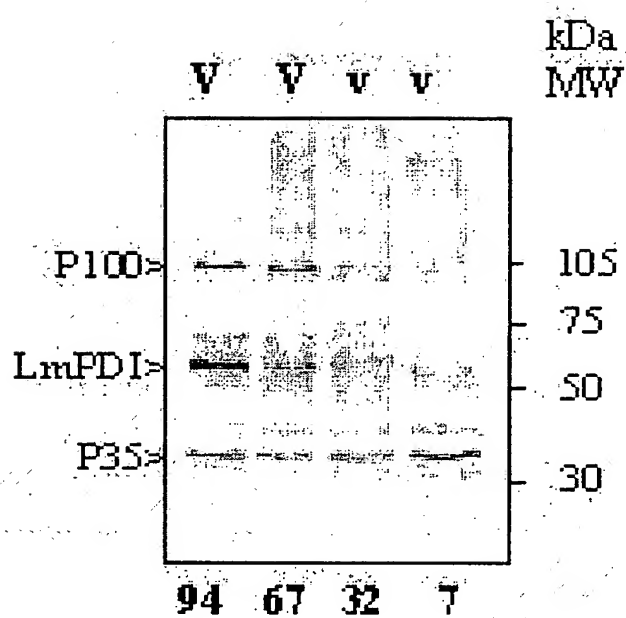


Figure 7

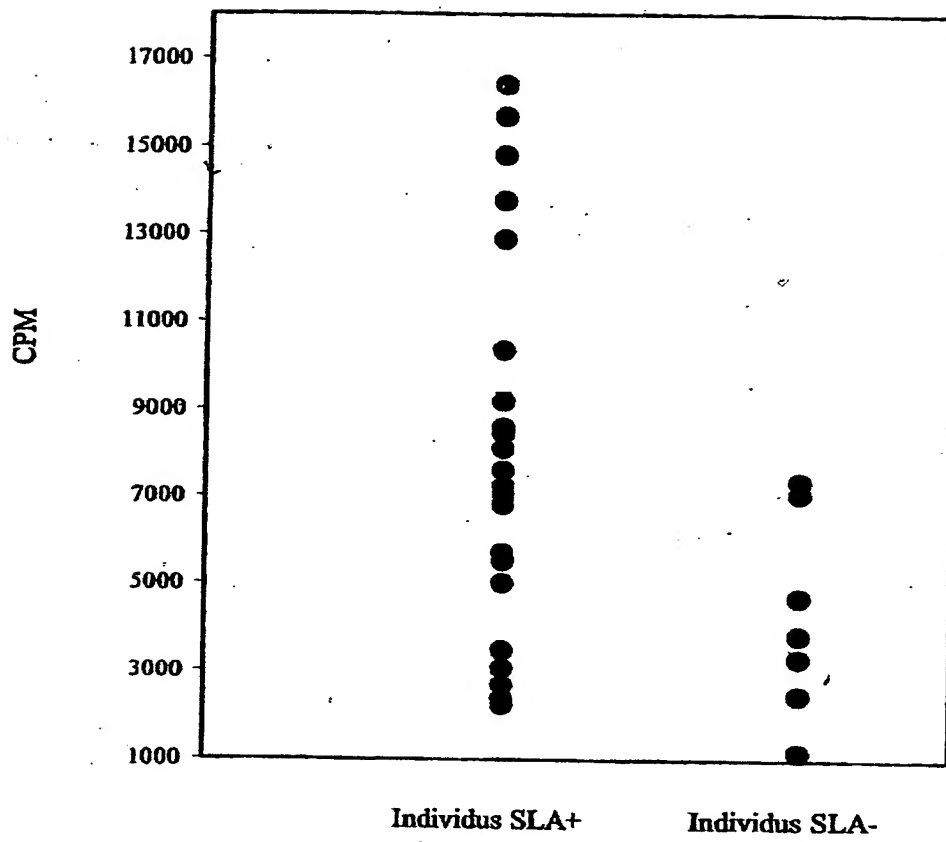


FIGURE 8

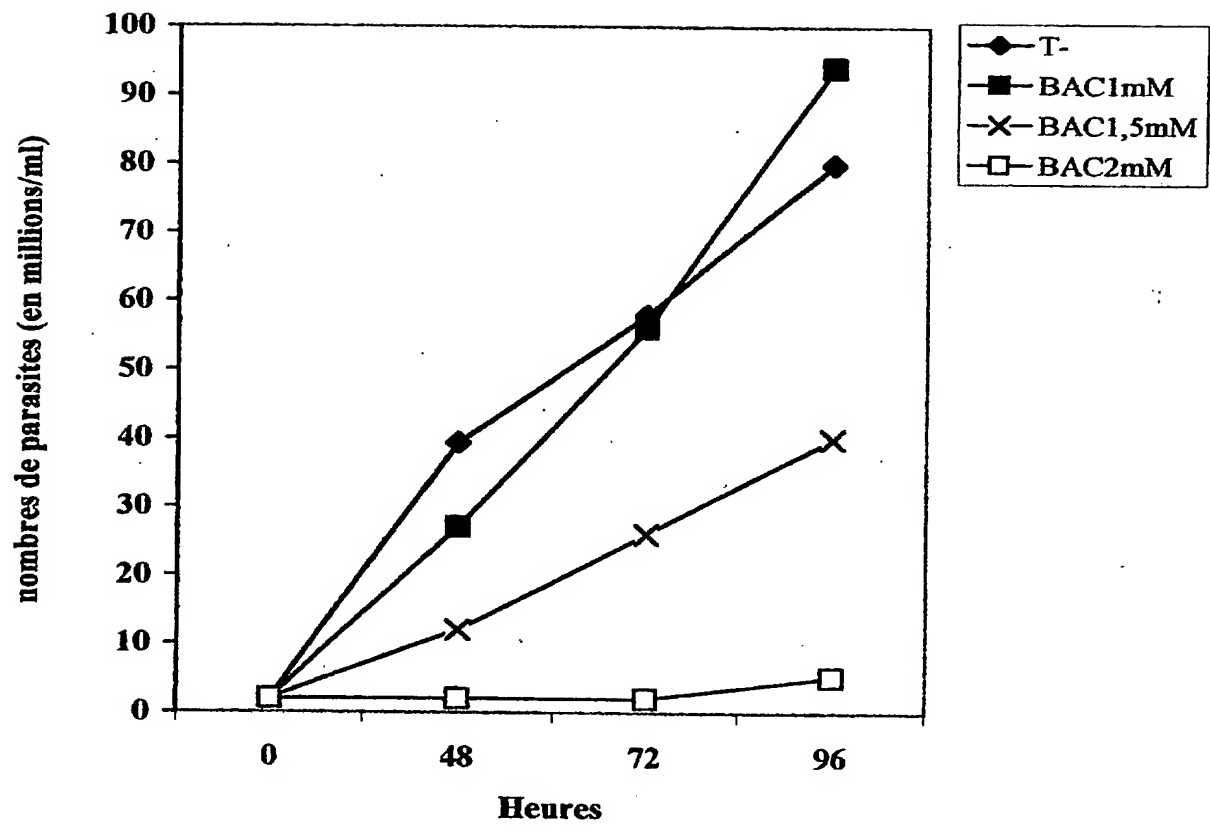


FIGURE 9

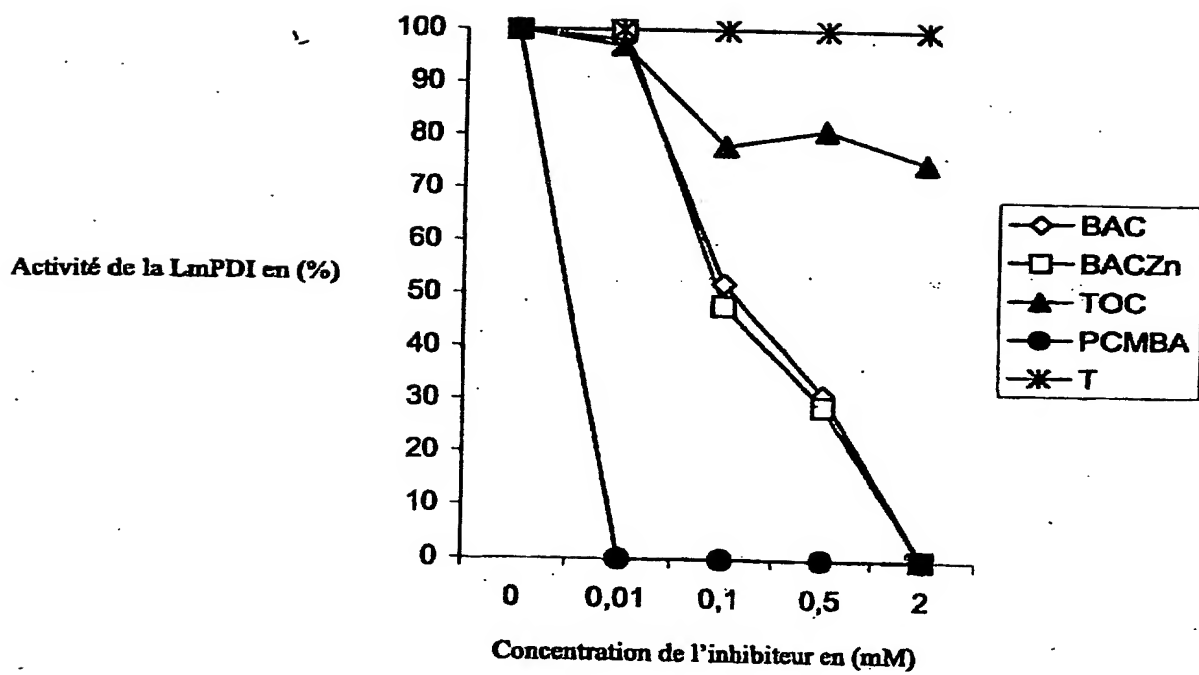


FIGURE 10

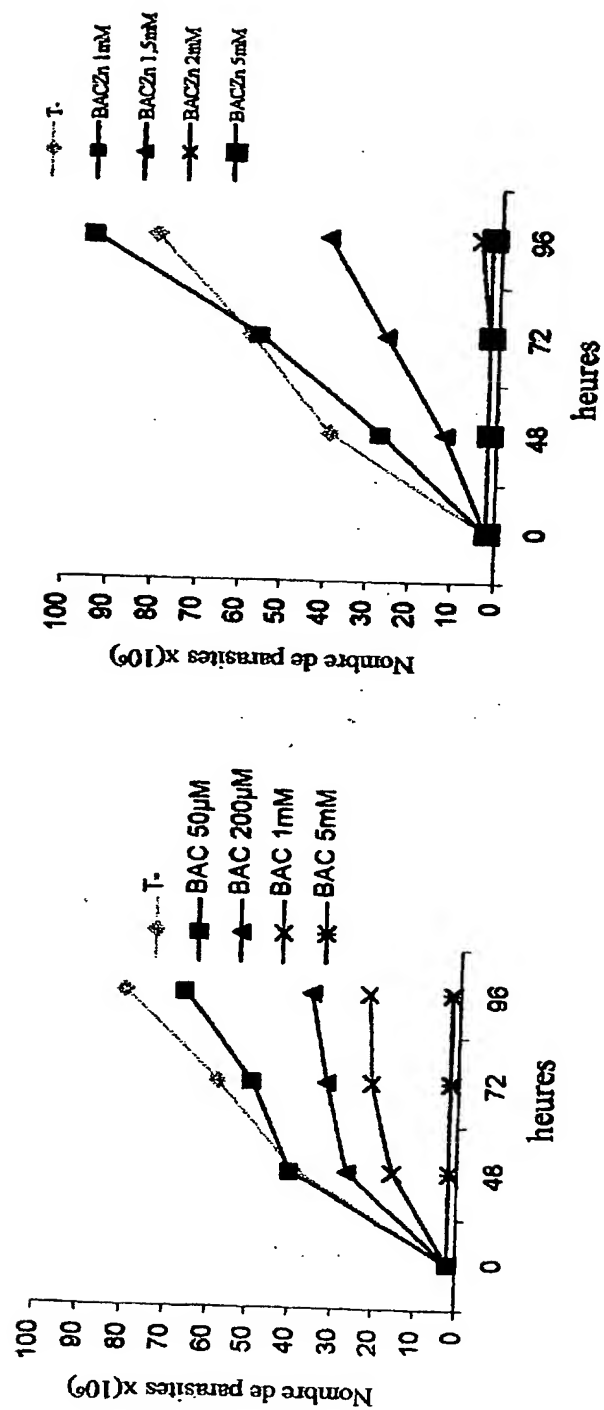


Figure 11 A

Figure 11 B

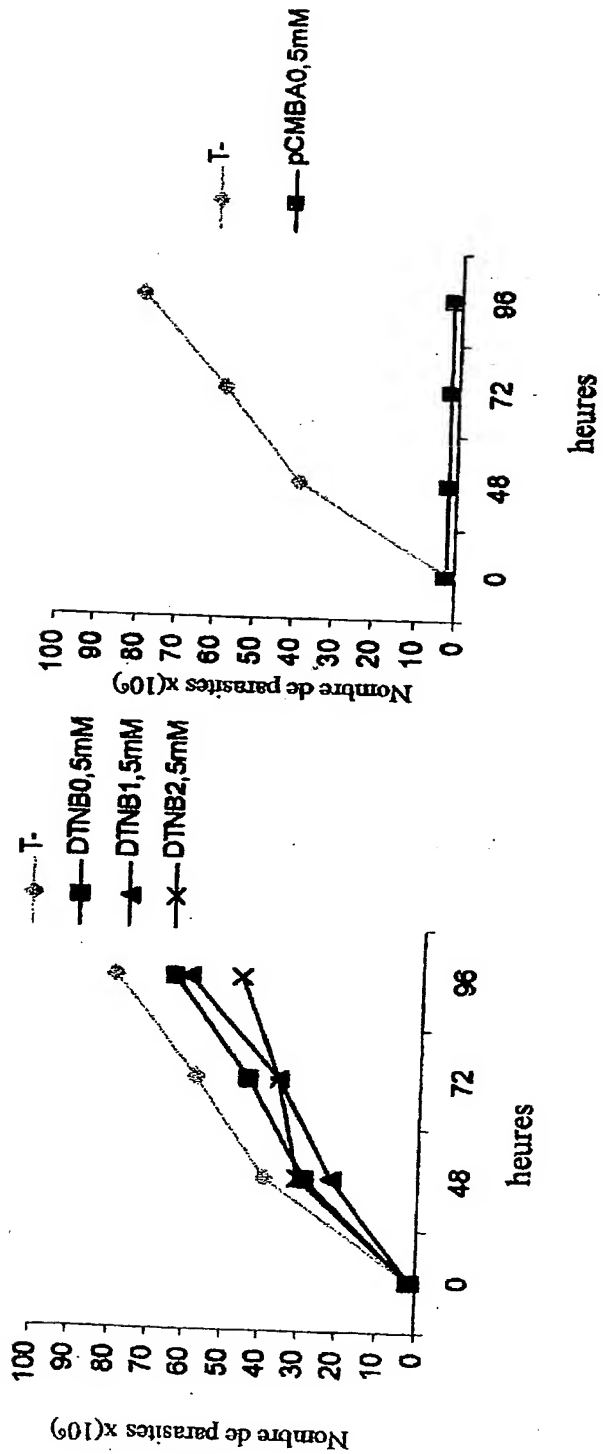


Figure 11 C

Figure 11 D

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR

INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

<120> GENE ASSOCIE A LA VIRULENCE DU PARASITE LEISHMANIA

<130> B4866 -AD/VMA

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2094

<212> ADN

<213> Leishmania major

<220>

<221> CDS

<222> (241)..(1674)

<223> Séquence codante (orf) de la LmPDI

<400> 1

ggcaccagcg gcaccagagt ttctgtactt tattgtcttt ctctattcta cccacacttg 60

cctctctgcg ctctctgtgc ctgtgcgggc ggcgaacgtg cctttctctc cgtattgccc 120

agctgtgagc tgctgcctac tggcaacgtg tacgccattc ccgtttcttg attctgggtgc 180

agtgtcagc tctaccctat ttgtattgat accgttttcc ttttcgtttt gcaaagaaaa 240

atg cag cgc tca ttc ctt gtt ttt gtt ctg tgc gcc ctt ctc ttc tgc 288

Met Gln Arg Ser Phe Leu Val Phe Val Leu Cys Ala Leu Leu Phe Cys

1

5

10

15

gtc gcg tcc gca gag gtg cag gtg gcc act aag gac aac ttt gac aag 336

Val Ala Ser Ala Glu Val Gln Val Ala Thr Lys Asp Asn Phe Asp Lys

20

25

30

gtc gta atc ggg gat ctc acg ttg gtc aag ttt tat gct ccg tgg tgc 384

Val Val Ile Gly Asp Leu Thr Leu Val Lys Phe Tyr Ala Pro Trp Cys

35

40

45

ggc cac tgc aag aca ctc gcc ccg gag ttt gta aag gcc gct gac atg 432

Gly	His	Cys	Lys	Thr	Leu	Ala	Pro	Glu	Phe	Val	Lys	Ala	Ala	Asp	Met		
50						55					60						
ctg gcc ggc atc gcg acc ctt gca gag gtc gat tgc acc aaa gaa gag																480	
Leu Ala Gly Ile Ala Thr Leu Ala Glu Val Asp Cys Thr Lys Glu Glu																	
65					70					75						80	
agc ctt gct gag aag tac gaa atc aag ggg ttc ccc acg ctg tac atc																528	
Ser Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Ile Lys Gly Phe Pro Thr Leu Tyr Ile																	
				85					90							95	
ttc cgt aac ggt gag aaa gtg aag atc tac gat ggt ccc cgc act gcc																576	
Phe Arg Asn Gly Glu Lys Val Lys Ile Tyr Asp Gly Pro Arg Thr Ala																	
			100					105								110	
gcc ggc atc gcg tcg tac atg aag gcg cat gtc ggt cca tcg atg aag																624	
Ala Gly Ile Ala Ser Tyr Met Lys Ala His Val Gly Pro Ser Met Lys																	
			115					120								125	
gcc atc tca acg gct gaa gag ctg gag gag ctc aag aag gag act ttc																672	
Ala Ile Ser Thr Ala Glu Glu Leu Glu Glu Leu Lys Lys Glu Thr Phe																	
			130					135								140	
ccg gtg tgc gtg gtg aag aca gcg agc acc gac tcg gag atg gcg tcg																720	
Pro Val Cys Val Val Lys Thr Ala Ser Thr Asp Ser Glu Met Ala Ser																	
			145					150								155	160
atg ata acc aag gtg gcg gac tct ctc cgc tcg cag atg aac ttt gtg																768	
Met Ile Thr Lys Val Ala Asp Ser Leu Arg Ser Gln Met Asn Phe Val																	
								165								170	175
ctc gtg acg gat gcg gcc atc tct ccg aat gat gcc atg gag tcg gtt																816	
Leu Val Thr Asp Ala Ala Ile Ser Pro Asn Asp Ala Met Glu Ser Val																	
								180								185	190
acg gtg tat cgc aag aat gcg gag cgc gag gcg tac acc ggc gct aca																864	
Thr Val Tyr Arg Lys Asn Ala Glu Arg Glu Ala Tyr Thr Gly Ala Thr																	
			195					200								205	
cca atg acg gca gag tcg gtg aag agc ttt ctc acg agt gct gtg ttg																912	
Pro Met Thr Ala Glu Ser Val Lys Ser Phe Leu Thr Ser Ala Val Leu																	
			210					215								220	
gac tac ttt ggc gag ctc ggc cag gag agc ttt cag aag tac atg gaa																960	
Asp Tyr Phe Gly Glu Leu Gly Gln Glu Ser Phe Gln Lys Tyr Met Glu																	
			225					230								235	240
gcg aac aag gat aaa cct ctt ggg tgg gtg ttc atc gac aag aac acg																1008	

Ala Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Trp Val Phe Ile Asp Lys Asn Thr	
245 250 255	
gat tct gcg ttg aag ggg tca ctt gtg gcg gtg gcg gag aag tac cgc	1056
Asp Ser Ala Leu Lys Gly Ser Leu Val Ala Val Ala Glu Lys Tyr Arg	
260 265 270	
tcg cag gtg ttg cta acc tac att gac ggc gat cag tac cgc ccc gtc	1104
Ser Gln Val Leu Leu Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Tyr Arg Pro Val	
275 280 285	
tcg cgc cag ctg ggc att cct gag gat gcg aag ttc ccg gcg ttt gtg	1152
Ser Arg Gln Leu Gly Ile Pro Glu Asp Ala Lys Phe Pro Ala Phe Val	
290 295 300	
gtc gat ttc gag cgc cgc cat cac gtg atg ggg acg gac acc cca gtc	1200
Val Asp Phe Glu Arg Arg His His Val Met Gly Thr Asp Thr Pro Val	
305 310 315 320	
acc tcc gag tct gtc gct gcg ttt gtg gag aag tat gtc aag ggc gag	1248
Thr Ser Glu Ser Val Ala Ala Phe Val Glu Lys Tyr Val Lys Gly Glu	
325 330 335	
acg aag cag acc gtg atg tcc gac gcg att ccc gct aag gag acg gtg	1296
Thr Lys Gln Thr Val Met Ser Asp Ala Ile Pro Ala Lys Glu Thr Val	
340 345 350	
aac ggc ctc aca acg gtg gtg ggt cag act ttt gcg aag tac acg gac	1344
Asn Gly Leu Thr Thr Val Val Gly Gln Thr Phe Ala Lys Tyr Thr Asp	
355 360 365	
ggc aca caa aac gtg atg ctg ctc ttc tac gcg ccg tgg tgc gga cac	1392
Gly Thr Gln Asn Val Met Leu Leu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His	
370 375 380	
tgc aag aag ctg cac ccc gtc tac gat aaa gta gcc aag agc ttc gag	1440
Cys Lys Lys Leu His Pro Val Tyr Asp Lys Val Ala Lys Ser Phe Glu	
385 390 395 400	
tct gag aat gtg atc att gcg aag atg gat gcc acg acg aac gac ttt	1488
Ser Glu Asn Val Ile Ile Ala Lys Met Asp Ala Thr Thr Asn Asp Phe	
405 410 415	
gac cgc gag aag ttt gag gtg tct gga ttt cca acg att tac ttc atc	1536
Asp Arg Glu Lys Phe Glu Val Ser Gly Phe Pro Thr Ile Tyr Phe Ile	
420 425 430	
cca gcc ggc aag ccg cca atc gtg tac gag ggt ggc cgc acc gca gac	1584

Pro Ala Gly Lys Pro Pro Ile Val Tyr Glu Gly Gly Arg Thr Ala Asp
 435 440 445

gaa atc cag gtg ttt gtg aag tct cac ctg acc gcc tcc gcc gct cca 1632
 Glu Ile Gln Val Phe Val Lys Ser His Leu Thr Ala Ser Ala Ala Pro
 450 455 460

tct ggc ggc cct tcc ggc aac agc gaa gag gaa gat ttg tag 1674
 Ser Gly Gly Pro Ser Gly Asn Ser Glu Glu Glu Asp Leu
 465 470 475

gactgcaagg gatgtggcgt ttataggctg ccctgccttc ccttgctggt tctatgacgg 1734
 attaggcttt tttttgttat atgtgggggtg gtcaagagag tgccagggct ccttctttat 1794
 atccttgccg tttcttttat tttgcttctt tgtgttgacg tctatgcatg cgtgctgtcg 1854
 acgactcttt gtcaacctgc gtccatctta gtagcatcga tgtgaaaaga agagtagagg 1914
 gaggtaacga tgcgtgcgct ggctgccgtt ttcattggcg caatttcgag aaggaaaatc 1974
 ggaaaatgga caggatagcg aaattagcgc aacgacaagg tcgtgcgtct ttctctatcg 2034
 gtcattaaat ttctgggctt tgtaacaatg aaagaagtca cacaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2094

<210> 2

<211> 477

<212> PRT

<213> Leishmania major

<400> 2

Met Gln Arg Ser Phe Leu Val Phe Val Leu Cys Ala Leu Leu Phe Cys
 1 5 10 15

Val Ala Ser Ala Glu Val Gln Val Ala Thr Lys Asp Asn Phe Asp Lys
 20 25 30

Val Val Ile Gly Asp Leu Thr Leu Val Lys Phe Tyr Ala Pro Trp Cys
 35 40 45

Gly His Cys Lys Thr Leu Ala Pro Glu Phe Val Lys Ala Ala Asp Met
 50 55 60

Leu Ala Gly Ile Ala Thr Leu Ala Glu Val Asp Cys Thr Lys Glu Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Ile Lys Gly Phe Pro Thr Leu Tyr Ile

85	90	95
Phe Arg Asn Gly Glu Lys Val Lys Ile Tyr Asp Gly Pro Arg Thr Ala		
100	105	110
Ala Gly Ile Ala Ser Tyr Met Lys Ala His Val Gly Pro Ser Met Lys		
115	120	125
Ala Ile Ser Thr Ala Glu Glu Leu Glu Glu Leu Lys Lys Glu Thr Phe		
130	135	140
Pro Val Cys Val Val Lys Thr Ala Ser Thr Asp Ser Glu Met Ala Ser		
145	150	155
		160
Met Ile Thr Lys Val Ala Asp Ser Leu Arg Ser Gln Met Asn Phe Val		
165	170	175
Leu Val Thr Asp Ala Ala Ile Ser Pro Asn Asp Ala Met Glu Ser Val		
180	185	190
Thr Val Tyr Arg Lys Asn Ala Glu Arg Glu Ala Tyr Thr Gly Ala Thr		
195	200	205
Pro Met Thr Ala Glu Ser Val Lys Ser Phe Leu Thr Ser Ala Val Leu		
210	215	220
Asp Tyr Phe Gly Glu Leu Gly Gln Glu Ser Phe Gln Lys Tyr Met Glu		
225	230	235
		240
Ala Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Trp Val Phe Ile Asp Lys Asn Thr		
245	250	255
Asp Ser Ala Leu Lys Gly Ser Leu Val Ala Val Ala Glu Lys Tyr Arg		
260	265	270
Ser Gln Val Leu Leu Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Tyr Arg Pro Val		
275	280	285
Ser Arg Gln Leu Gly Ile Pro Glu Asp Ala Lys Phe Pro Ala Phe Val		
290	295	300
Val Asp Phe Glu Arg Arg His His Val Met Gly Thr Asp Thr Pro Val		
305	310	315
		320
Thr Ser Glu Ser Val Ala Ala Phe Val Glu Lys Tyr Val Lys Gly Glu		
325	330	335
Thr Lys Gln Thr Val Met Ser Asp Ala Ile Pro Ala Lys Glu Thr Val		

50		55		60
Ala Glu Lys Tyr Glu Ile Lys Gly Phe Pro Thr Leu Tyr Ile Phe Arg				
65		70		75
				80
Asn Gly Glu Lys Val Lys Ile Tyr Asp Gly Pro Arg Thr Ala Ala Gly				
	85		90	95
Ile Ala Ser Tyr Met Lys Ala His Val Gly Pro Ser Met Lys Ala Ile				
	100		105	110
Ser Thr Ala Glu Glu Leu Glu Glu Leu Lys Lys Glu Thr Phe Pro Val				
	115		120	125
Cys Val Val Lys Thr Ala Ser Thr Asp Ser Glu Met Ala Ser Met Ile				
	130		135	140
Thr Lys Val Ala Asp Ser Leu Arg Ser Gln Met Asn Phe Val Leu Val				
145		150		155
				160
Thr Asp Ala Ala Ile Ser Pro Asn Asp Ala Met Glu Ser Val Thr Val				
	165		170	175
Tyr Arg Lys Asn Ala Glu Arg Glu Ala Tyr Thr Gly Ala Thr Pro Met				
	180		185	190
Thr Ala Glu Ser Val Lys Ser Phe Leu Thr Ser Ala Val Leu Asp Tyr				
	195		200	205
Phe Gly Glu Leu Gly Gln Glu Ser Phe Gln Lys Tyr Met Glu Ala Asn				
210		215		220
Lys Asp Lys Pro Leu Gly Trp Val Phe Ile Asp Lys Asn Thr Asp Ser				
225		230		235
				240
Ala Leu Lys Gly Ser Leu Val Ala Val Ala Glu Lys Tyr Arg Ser Gln				
	245		250	255
Val Leu Leu Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Tyr Arg Pro Val Ser Arg				
	260		265	270
Gln Leu Gly Ile Pro Glu Asp Ala Lys Phe Pro Ala Phe Val Val Asp				
	275		280	285
Phe Glu Arg Arg His His Val Met Gly Thr Asp Thr Pro Val Thr Ser				
	290		295	300
Glu Ser Val Ala Ala Phe Val Glu Lys Tyr Val Lys Gly Glu Thr Lys				

```
<210> 4
<211> 497
<212> PRT
<213> T. brucei
```

Met Arg Ala Ile Phe Leu Val Ala Leu Ala Leu Ala Thr Met Arg Glu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Glu Ser Leu Lys Leu Thr Lys Glu Asn Phe Asn Glu Thr
20 25 30

Ile Ala Lys Ser Glu Ile Phe Leu Val Lys Phe Tyr Val Asp Thr Cys
35 40 45

Gly	Tyr	Cys	Gln	Met	Leu	Ala	Pro	Glu	Trp	Glu	Lys	Ala	Ala	Asn	Glu	50	55	60	
Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Leu	Met	Gly	Glu	Val	Asp	Cys	His	Ser	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Leu	Ala	Ala	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Gly	Tyr	Pro	Thr	Ile	Ile	Leu	85	90	95	
Phe	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Ala	Glu	His	Tyr	Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Lys	100	105	110	
Asp	Asp	Ile	Ile	Lys	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Val	Gly	Pro	Ala	Val	Thr	115	120	125	
Pro	Ala	Ser	Asn	Ala	Glu	Glu	Val	Thr	Arg	Ala	Lys	Glu	Glu	His	Asp	130	135	140	
Val	Val	Cys	Val	Gly	Leu	Thr	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Thr	145	150	155	160
Thr	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Gln	Ser	Phe	Arg	Val	Ser	Leu	Lys	Phe	Phe	165	170	175	
Glu	Ala	Glu	Pro	Lys	Leu	Phe	Pro	Asp	Glu	Lys	Pro	Glu	Thr	Ile	Val	180	185	190	
Val	Tyr	Arg	Lys	Gly	Gly	Glu	Lys	Glu	Val	Tyr	Asp	Gly	Pro	Met	Glu	195	200	205	
Val	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Phe	Leu	Gln	Ile	Ser	Arg	Val	Ala	Phe	Gly	210	215	220	
Gly	Glu	Ile	Thr	Pro	Glu	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Val	Ile	Lys	Arg	225	230	235	240
Pro	Val	Gly	Trp	Ala	Met	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Glu	245	250	255	
Leu	Lys	Glu	Ser	Leu	Thr	Glu	Val	Gly	Lys	Lys	Met	Arg	Ser	His	Met	260	265	270	
Val	Val	Leu	Trp	Val	Asn	Ile	Ser	Lys	His	Pro	Val	Trp	Arg	Asp	Phe	275	280	285	
Gly	Val	Pro	Glu	Asp	Ala	Lys	Tyr	Pro	Ala	Phe	Leu	Ala	Ile	His	Trp	290	295	300	

Gly Ala Asn Tyr Leu His Ser Thr Ala Glu Val Val Thr Arg Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Glu Lys Phe Ile Leu Glu Phe Ala Ala Gly Arg Val Glu Pro Thr
 325 330 335
 Ile Lys Ser Leu Pro Val Pro Glu Val Glu Thr Val Asp Gly Lys Thr
 340 345 350
 Thr Ile Val Ala Lys Thr Met Gln Lys His Leu Thr Ser Gly Lys Asp
 355 360 365
 Met Leu Ile Leu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Asn Phe
 370 375 380
 Ala Pro Thr Phe Asp Lys Ile Ala Lys Glu Phe Asp Ala Thr Asp Leu
 385 390 395 400
 Ile Val Ala Glu Leu Asp Ala Thr Ala Asn Tyr Val Asn Ser Ser Thr
 405 410 415
 Phe Thr Val Thr Ala Phe Pro Thr Val Phe Phe Val Pro Asn Gly Gly
 420 425 430
 Lys Pro Val Val Phe Glu Gly Glu Arg Ser Phe Glu Asn Val Tyr Glu
 435 440 445
 Phe Val Arg Lys His Val Thr Thr Phe Lys Val Ser Glu Lys Pro Ala
 450 455 460
 Asn Val Thr Glu Glu Lys Lys Ser Glu Glu Glu Asn Lys Ser Ser Lys
 465 470 475 480
 Ser Asn Glu Ser Asn Asp Ser Asn Glu Ser Asn Val Asp Lys Gln Asp
 485 490 495

Leu

<210> 5
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> H. jecorina

<400> 5

Met Gln Gln Lys Arg Leu Thr Ala Ala Leu Val Ala Ala Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Val Ser Ala Glu Ser Asp Val Lys Ser Leu Thr Lys Asp Thr Phe
 20 25 30
 Asn Asp Phe Ile Asn Ser Asn Asp Leu Val Leu Ala Glu Ser Phe Ala
 35 40 45
 Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Glu Tyr Glu Glu Ala
 50 55 60
 Ala Thr Thr Leu Lys Asp Lys Ser Ile Lys Leu Ala Lys Val Asp Cys
 65 70 75 80
 Val Glu Glu Ala Asp Leu Cys Lys Glu His Gly Val Glu Gly Tyr Pro
 85 90 95
 Thr Leu Lys Val Phe Arg Gly Leu Asp Lys Val Ala Pro Tyr Thr Gly
 100 105 110
 Pro Arg Lys Ala Asp Gly Ile Thr Ser Tyr Met Val Lys Gln Ser Leu
 115 120 125
 Pro Ala Val Ser Ala Leu Thr Lys Asp Thr Leu Glu Asp Phe Lys Thr
 130 135 140
 Ala Asp Lys Val Val Leu Val Ala Tyr Ile Ala Ala Asp Asp Lys Ala
 145 150 155 160
 Ser Asn Glu Thr Phe Thr Ala Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Phe Gly Gly Val Asn Asp Ala Ala Val Ala Glu Ala Glu Gly Val
 180 185 190
 Lys Phe Pro Ser Ile Val Leu Tyr Lys Ser Phe Asp Glu Gly Lys Asn
 195 200 205
 Val Phe Ser Glu Lys Phe Asp Ala Glu Ala Ile Arg Asn Phe Ala Gln
 210 215 220
 Val Ala Ala Thr Pro Leu Val Gly Glu Val Gly Pro Glu Thr Tyr Ala
 225 230 235 240
 Gly Tyr Met Ser Ala Gly Ile Pro Leu Ala Tyr Ile Phe Ala Glu Thr
 245 250 255

Ala Glu Glu Arg Glu Asn Leu Ala Lys Thr Leu Lys Pro Val Ala Glu
 260 265 270
 Lys Tyr Lys Gly Lys Ile Asn Phe Ala Thr Ile Asp Ala Lys Asn Phe
 275 280 285
 Gly Ser His Ala Gly Asn Ile Asn Leu Lys Thr Asp Lys Phe Pro Ala
 290 295 300
 Phe Ala Ile His Asp Ile Glu Lys Asn Leu Lys Phe Pro Phe Asp Gln
 305 310 315 320
 Ser Lys Glu Ile Thr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Phe Val Asp Gly Phe
 325 330 335
 Ser Ser Gly Lys Ile Glu Ala Ser Ile Lys Ser Glu Pro Ile Pro Glu
 340 345 350
 Thr Gln Glu Gly Pro Val Thr Val Val Val Ala His Ser Tyr Lys Asp
 355 360 365
 Ile Val Leu Asp Asp Lys Lys Asp Val Leu Ile Glu Phe Tyr Thr Pro
 370 375 380
 Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Lys Tyr Asp Glu Leu Ala
 385 390 395 400
 Ser Leu Tyr Ala Lys Ser Asp Phe Lys Asp Lys Val Val Ile Ala Lys
 405 410 415
 Val Asp Ala Thr Ala Asn Asp Val Pro Asp Glu Ile Gln Gly Phe Pro
 420 425 430
 Thr Ile Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Asp Lys Lys Asn Pro Val Thr Tyr
 435 440 445
 Ser Gly Ala Arg Thr Val Glu Asp Phe Ile Glu Phe Ile Lys Glu Asn
 450 455 460
 Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Val Glu Ile Pro Ala Glu Pro Thr Glu Glu
 465 470 475 480
 Ala Glu Ala Ser Glu Ser Lys Ala Ser Glu Glu Ala Lys Ala Ser Glu
 485 490 495
 Glu Thr His Asp Glu Leu
 500

<210> 6

<211> 488

<212> PRT

<213> C. elegans

<400> 6

Met Ile Trp Val Gln Ala Ala Leu Val Ala Ser Phe Leu Ala Phe Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Gly Gly Ala Val Leu Glu Tyr Thr Asp Gly Asn Phe Asp Asp
 20 25 30

Leu Ile Gln Thr His Asp Ile Ala Leu Val Lys Phe Tyr Ala Pro Trp
 35 40 45

Cys Gly His Cys Lys Lys Ile Ala Pro Glu Tyr Glu Arg Ala Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Ala Ser Asn Asp Pro Pro Val Ala Leu Val Lys Val Asp Cys
 65 70 75 80

Thr Thr Glu Lys Thr Val Cys Asp Lys Phe Gly Val Lys Gly Phe Pro
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Phe Arg Asn Gly Val Pro Ala Gln Asp Tyr Asp Gly
 100 105 110

Pro Arg Asp Ala Asp Gly Ile Val Lys Phe Met Arg Gly Gln Ser Gly
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Glu Leu Lys Thr Val Ala Glu Phe Glu Lys Phe Thr
 130 135 140

Gly Gly Asp Glu Asn Val Val Ile Gly Phe Phe Glu Ser Glu Ser Lys
 145 150 155 160

Leu Lys Asp Ser Tyr Leu Lys Val Ala Asp Thr Glu Arg Asp Arg Phe
 165 170 175

Ser Phe Ala His Thr Ser Asn Lys Asp Ile Ile Lys Lys Ala Gly Tyr
 180 185 190

Ser Asp Asp Val Val Val Phe Val Pro Lys Lys Leu His Asn Lys Phe
 195 200 205

Asp Thr Asn Glu Phe Lys Tyr Asp Gly Asn Tyr Asp Thr Asp Lys Ile

210 215 220
 Lys Asn Phe Leu Val His Glu Thr Val Gly Phe Ala Gly Ile Arg Thr
 225 230 235 240
 Gln Gly Asn Leu Phe Gln Phe Glu Gln Lys Pro Ile Val Ile Val Tyr
 245 250 255
 Tyr Asn Val Asp Tyr Val Lys Asp Pro Lys Gly Ser Asn Tyr Trp Arg
 260 265 270
 Asn Arg Val Leu Lys Val Ala Gln Asn Tyr Lys Arg Lys Val Gln Phe
 275 280 285
 Ala Val Ser Asn Lys Glu Glu Phe Ser Ser Glu Ile Glu Thr Asn Gly
 290 295 300
 Leu Gly Glu Arg Lys Asp Ser Asp Lys Pro Ile Val Ala Ile Leu Thr
 305 310 315 320
 Asn Glu Gly Lys Tyr Pro Met Asp Gln Glu Phe Ser Val Asp Asn Leu
 325 330 335
 Gln Gln Phe Val Asp Glu Val Leu Ala Gly Asn Ala Glu Pro Tyr Met
 340 345 350
 Lys Ser Glu Pro Ile Pro Asp Glu Gln Gly Asp Val Lys Val Ala Val
 355 360 365
 Gly Lys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Met Asp Ala Asp Lys Asp Val Leu
 370 375 380
 Ile Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ser Leu Ala Pro
 385 390 395 400
 Lys Tyr Glu Glu Leu Ala Glu Lys Leu Asn Lys Glu Asp Val Ile Ile
 405 410 415
 Ala Lys Met Asp Ala Thr Ala Asn Asp Val Pro Pro Met Phe Glu Val
 420 425 430
 Arg Gly Phe Pro Thr Leu Phe Trp Leu Pro Lys Asn Ala Lys Ser Asn
 435 440 445
 Pro Ile Pro Tyr Asn Gly Gly Arg Glu Val Lys Asp Phe Val Ser Phe
 450 455 460
 Ile Ser Lys His Ser Thr Asp Gly Leu Lys Gly Phe Ser Arg Asp Gly

465

470

475

480

Lys Lys Lys Lys Lys Thr Glu Leu

485

<210> 7

<211> 532

<212> PRT

<213> C. reinhard

<400> 7

Met Asn Arg Trp Asn Leu Leu Ala Leu Thr Leu Gly Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Phe Thr Lys His Gln Phe Ala His Ala Ser Asp Glu Tyr
 20 25 30

Glu Asp Asp Glu Glu Asp Asp Ala Pro Ala Ala Pro Lys Asp Asp Asp
 35 40 45

Val Asp Val Thr Val Val Thr Val Lys Asn Trp Asp Glu Thr Val Lys
 50 55 60

Lys Ser Lys Phe Ala Leu Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His
 65 70 75 80

Cys Lys Thr Leu Lys Pro Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Thr Ala Leu Lys
 85 90 95

Ala Ala Ala Pro Asp Ala Leu Ile Ala Lys Val Asp Ala Thr Gln Glu
 100 105 110

Glu Ser Leu Ala Gln Lys Phe Gly Val Gln Gly Tyr Pro Thr Leu Lys
 115 120 125

Trp Phe Val Asp Gly Glu Leu Ala Ser Asp Tyr Asn Gly Pro Arg Asp
 130 135 140

Ala Asp Gly Ile Val Gly Trp Val Lys Lys Lys Thr Gly Pro Pro Ala
 145 150 155 160

Val Thr Val Glu Asp Ala Asp Lys Leu Lys Ser Leu Glu Ala Asp Ala
 165 170 175

Glu Val Val Val Val Gly Tyr Phe Lys Ala Leu Glu Gly Glu Ile Tyr
 180 185 190

Asp Thr Phe Lys Ser Tyr Ala Ala Lys Thr Glu Asp Val Val Phe Val
 195 200 205
 Gln Thr Thr Ser Ala Asp Val Ala Lys Ala Ala Gly Leu Asp Ala Val
 210 215 220
 Asp Thr Val Ser Val Val Lys Asn Phe Ala Gly Glu Asp Arg Ala Thr
 225 230 235 240
 Ala Val Leu Ala Thr Asp Ile Asp Thr Asp Ser Leu Thr Ala Phe Val
 245 250 255
 Lys Ser Glu Lys Met Pro Pro Thr Ile Glu Phe Asn Gln Lys Asn Ser
 260 265 270
 Asp Lys Ile Phe Asn Ser Gly Ile Asn Lys Gln Leu Ile Leu Trp Thr
 275 280 285
 Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ala Asp Ala Glu Ile Met Thr Val Phe Arg
 290 295 300
 Glu Ala Ser Lys Lys Phe Lys Gly Gln Leu Val Phe Val Thr Val Asn
 305 310 315 320
 Asn Glu Gly Asp Gly Ala Asp Pro Val Thr Asn Phe Phe Gly Leu Lys
 325 330 335
 Gly Ala Thr Ser Pro Val Leu Leu Gly Phe Phe Met Glu Lys Asn Lys
 340 345 350
 Lys Phe Arg Met Glu Gly Glu Phe Thr Ala Asp Asn Val Ala Lys Phe
 355 360 365
 Ala Glu Ser Val Val Asp Gly Thr Ala Gln Ala Val Leu Lys Ser Glu
 370 375 380
 Ala Ile Pro Glu Asp Pro Tyr Glu Asp Gly Val Tyr Lys Ile Val Gly
 385 390 395 400
 Lys Thr Val Glu Ser Val Val Leu Asp Glu Thr Lys Asp Val Leu Leu
 405 410 415
 Glu Val Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Lys Leu Glu Pro Ile
 420 425 430
 Tyr Lys Lys Leu Ala Lys Arg Phe Lys Lys Val Asp Ser Val Ile Ile
 435 440 445

Ala Lys Met Asp Gly Thr Glu Asn Glu His Pro Glu Ile Glu Val Lys
 450 455 460

Gly Phe Pro Thr Ile Leu Phe Tyr Pro Ala Gly Ser Asp Arg Thr Pro
 465 470 475 480

Ile Val Phe Glu Gly Gly Asp Arg Ser Leu Lys Ser Leu Thr Lys Phe
 485 490 495

Ile Lys Thr Asn Ala Lys Ile Pro Tyr Glu Leu Pro Lys Lys Gly Ser
 500 505 510

Asp Gly Asp Glu Gly Thr Ser Asp Asp Lys Asp Lys Pro Ala Ser Asp
 515 520 525

Lys Asp Glu Leu
 530

<210> 8

<211> 496

<212> PRT

<213> D. melano

<400> 8

Met Lys Phe Leu Ile Cys Ala Leu Phe Leu Ala Ala Ser Tyr Val Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Glu Ala Glu Val Lys Val Glu Glu Gly Val Leu Val Ala
 20 25 30

Thr Val Asp Asn Phe Lys Gln Leu Ile Ala Asp Asn Glu Phe Val Leu
 35 40 45

Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro
 50 55 60

Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Gln Gln Leu Ala Glu Lys Glu Ser Pro Ile
 65 70 75 80

Lys Leu Ala Lys Val Asp Ala Thr Val Glu Gly Glu Leu Ala Glu Gln
 85 90 95

Tyr Ala Val Arg Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Phe Phe Arg Ser Gly Ser
 100 105 110

Pro Val Glu Tyr Ser Gly Gly Arg Gln Ala Ala Asp Ile Ile Ala Trp
115 120 125

Val Thr Lys Lys Thr Gly Pro Pro Ala Lys Asp Leu Thr Ser Val Ala
130 135 140

Asp Ala Glu Gln Phe Leu Lys Asp Asn Glu Ile Ala Ile Ile Gly Phe
145 150 155 160

Phe Lys Asp Leu Glu Ser Glu Glu Ala Lys Thr Phe Thr Lys Val Ala
165 170 175

Asn Ala Leu Asp Ser Phe Val Phe Gly Val Ser Ser Asn Ala Asp Val
180 185 190

Ile Ala Lys Tyr Glu Ala Lys Asp Asn Gly Val Val Leu Phe Lys Pro
195 200 205

Phe Asp Asp Lys Lys Ser Val Phe Glu Gly Glu Leu Asn Glu Glu Asn
210 215 220

Leu Lys Lys Phe Ala Gln Val Gln Ser Leu Pro Leu Ile Val Asp Phe
225 230 235 240

Asn His Glu Ser Ala Ser Lys Ile Phe Gly Gly Ser Ile Lys Ser His
245 250 255

Leu Leu Phe Phe Val Ser Arg Glu Gly Gly His Ile Glu Lys Tyr Val
260 265 270

Asp Pro Leu Lys Glu Ile Ala Lys Lys Tyr Arg Asp Asp Ile Leu Phe
275 280 285

Val Thr Ile Ser Ser Asp Glu Glu Asp His Thr Arg Ile Phe Glu Phe
290 295 300

Phe Gly Met Asn Lys Glu Glu Val Pro Thr Ile Arg Leu Ile Lys Leu
305 310 315 320

Glu Glu Asp Met Ala Lys Tyr Lys Pro Glu Ser Asp Asp Leu Ser Ala
325 330 335

Glu Thr Ile Glu Ala Phe Leu Lys Lys Phe Leu Asp Gly Lys Leu Lys
340 345 350

Gln His Leu Leu Ser Gln Glu Leu Pro Glu Asp Trp Asp Lys Asn Pro
355 360 365

Val Lys Val Leu Val Ser Ser Asn Phe Glu Ser Val Ala Leu Asp Lys
 370 375 380

Ser Lys Ser Val Leu Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
 385 390 395 400

Lys Gln Leu Ala Pro Ile Tyr Asp Gln Leu Ala Glu Lys Tyr Lys Asp
 405 410 415

Asn Glu Asp Ile Val Ile Ala Lys Met Asp Ser Thr Ala Asn Glu Leu
 420 425 430

Glu Ser Ile Lys Ile Ser Ser Phe Pro Thr Ile Lys Tyr Phe Arg Lys
 435 440 445

Glu Asp Asn Lys Val Ile Asp Phe Asn Leu Asp Arg Thr Leu Asp Asp
 450 455 460

Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Asn Gly Glu Val Ala Asp Ser Glu Pro
 465 470 475 480

Val Glu Glu Thr Glu Glu Glu Glu Glu Ala Pro Lys Lys Asp Glu Leu
 485 490 495

<210> 9

<211> 481

<212> PRT

<213> C. parvum

<400> 9

Met Ile Gly Ile Arg Ser Leu Val Ser Ala Ala Phe Leu Gly Phe Ser
 1 5 10 15

Cys Leu Ser Lys Val Val Leu Gly Gly Asp Glu Ala His Phe Ile Ser
 20 25 30

Glu His Ile Thr Ser Leu Thr Ser Ser Asn Phe Glu Asp Phe Ile Lys
 35 40 45

Ser Lys Glu His Val Ile Val Thr Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His
 50 55 60

Cys Thr Ala Leu Glu Pro Glu Phe Lys Ala Thr Cys Ala Glu Ile Ser

65	70	75	80
Lys Leu Ser Pro Pro Val His Cys Gly Ser Val Asp Ala Thr Glu Asn			
85	90	95	
Met Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Gly Val Ser Gly Tyr Pro Thr Ile Lys			
100	105	110	
Phe Phe Ser Gly Ile Asp Ser Val Gln Asn Tyr Ser Gly Ala Arg Ser			
115	120	125	
Lys Asp Ala Phe Ile Lys Tyr Ile Lys Lys Leu Thr Gly Pro Ala Val			
130	135	140	
Gln Val Ala Glu Ser Glu Glu Ala Ile Lys Thr Ile Phe Ala Ser Ser			
145	150	155	160
Ser Ser Ala Phe Val Gly Arg Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ala Glu Tyr			
165	170	175	
Ala Val Phe Glu Lys Val Ala Ser Gly His Arg Glu His Asn Tyr Ala			
180	185	190	
Phe Ile Ala Phe Phe Gln Glu Gly Glu Gln Lys Leu Glu Val Leu His			
195	200	205	
Lys Asp Glu Glu Pro Val Ser Leu Pro Met Pro Lys Thr Val Glu Glu			
210	215	220	
Leu Glu Ala Lys Ile Ser Ile Met Asn Val Pro Leu Phe Ser Ala Ile			
225	230	235	240
Ser Ala Glu Asn Tyr Ser Leu Tyr Met Ser Arg Glu Gly Tyr Thr Pro			
245	250	255	
Gly Ser Val Val Leu Thr Arg Thr Ser Pro Ser Met Leu Gln Thr Leu			
260	265	270	
Glu Arg Leu Gln Leu Ile Thr Glu Lys Ser Met Pro Leu Phe Ser Leu			
275	280	285	
Asp Thr Glu Gln Phe Gly Ser His Ala Thr Gln His Leu Leu Ile Glu			
290	295	300	
Lys Phe Pro Gly Leu Val Ile Gln Ser Val Asn Val Pro Ser Ile Arg			
305	310	315	320
Tyr Met Tyr Gly Pro Ala Lys Phe Asp Ser Val Glu Pro Leu Lys Glu			

[illegible]

<210> 10

<211> 508

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Arg Arg Ala Leu Leu Cys Leu Ala Val Ala Ala Leu Val Arg
1 5 10 15

Ala Asp Ala Pro Glu Glu Glu Asp His Val Leu Val Leu Arg Lys Ser
20 25 30

Asn Phe Ala Glu Ala Leu Ala Ala His Lys Tyr Leu Leu Val Glu Phe
35 40 45

Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro Glu Tyr Ala
 50 55 60

Lys Ala Ala Gly Lys Leu Lys Ala Glu Gly Ser Glu Ile Arg Leu Ala
 65 70 75 80

Lys Val Asp Ala Thr Glu Glu Ser Asp Leu Ala Gln Gln Tyr Gly Val
 85 90 95

Arg Gly Tyr Pro Thr Ile Lys Phe Phe Arg Asn Gly Asp Thr Ala Ser
 100 105 110

Pro Lys Glu Tyr Thr Ala Gly Arg Glu Ala Asp Asp Ile Val Asn Trp
 115 120 125

Leu Lys Lys Arg Thr Gly Pro Ala Ala Thr Thr Leu Pro Asp Gly Ala
 130 135 140

Ala Ala Glu Ser Leu Val Glu Ser Ser Glu Val Ala Val Ile Gly Phe
 145 150 155 160

Phe Lys Asp Val Glu Ser Asp Ser Ala Lys Gln Phe Leu Gln Ala Ala
 165 170 175

Glu Ala Ile Asp Asp Ile Pro Phe Gly Ile Thr Ser Asn Ser Asp Val
 180 185 190

Phe Ser Lys Tyr Gln Leu Asp Lys Asp Gly Val Val Leu Phe Lys Lys
 195 200 205

Phe Asp Glu Gly Arg Asn Asn Phe Glu Gly Glu Val Thr Lys Glu Asn
 210 215 220

Leu Leu Asp Phe Ile Lys His Asn Gln Leu Pro Leu Val Ile Glu Phe
 225 230 235 240

Thr Glu Gln Thr Ala Pro Lys Ile Phe Gly Gly Glu Ile Lys Thr His
 245 250 255

Ile Leu Leu Phe Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Tyr Asp Gly Lys Leu
 260 265 270

Ser Asn Phe Lys Thr Ala Ala Glu Ser Phe Lys Gly Lys Ile Leu Phe
 275 280 285

Ile Phe Ile Asp Ser Asp His Thr Asp Asn Gln Arg Ile Leu Glu Phe
 290 295 300

Phe Gly Leu Lys Lys Glu Glu Cys Pro Ala Val Arg Leu Ile Thr Leu
 305 310 315 320

Glu Glu Glu Met Thr Lys Tyr Lys Pro Glu Ser Glu Glu Leu Thr Ala
 325 330 335

Glu Arg Ile Thr Glu Phe Cys His Arg Phe Leu Glu Gly Lys Ile Lys
 340 345 350

Pro His Leu Met Ser Gln Glu Leu Pro Glu Asp Trp Asp Lys Gln Pro
 355 360 365

Val Lys Val Leu Val Gly Lys Asn Phe Glu Asp Val Ala Phe Asp Glu
 370 375 380

Lys Lys Asn Val Phe Val Glu Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys
 385 390 395 400

Lys Gln Leu Ala Pro Ile Trp Asp Lys Leu Gly Glu Thr Tyr Lys Asp
 405 410 415

His Glu Asn Ile Val Ile Ala Lys Met Asp Ser Thr Ala Asn Glu Val
 420 425 430

Glu Ala Val Lys Val His Ser Phe Pro Thr Leu Lys Phe Phe Pro Ala
 435 440 445

Ser Ala Asp Arg Thr Val Ile Asp Tyr Asn Gly Glu Arg Thr Leu Asp
 450 455 460

Gly Phe Lys Lys Phe Leu Glu Ser Gly Gly Gln Asp Gly Ala Gly Asp
 465 470 475 480

Asp Asp Asp Leu Glu Asp Leu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Asp Met Glu
 485 490 495

Glu Asp Asp Asp Gln Lys Ala Val Lys Asp Glu Leu
 500 505



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B4866-VMA	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0107985	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) GENE ASSOCIE A LA VIRULENCE DU PARASITE LEISHMANIA.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT PASTEUR DE TUNIS INSTITUT PASTEUR Représentés par : ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD S.A. 3 rue Chauveau-Lagarde - FR-75008 PARIS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BEN ACHOUR	
Prénoms		Yosser	
Adresse	Rue	31 avenue de la République	
	Code postal et ville	2070	LA MARSA (Tunisie)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CHENIK	
Prénoms		Mehdi	
Adresse	Rue	31 avenue de la République	
	Code postal et ville	2070	LA MARSA (Tunisie)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LOUZIR	
Prénoms		Hechmi	
Adresse	Rue	12 avenue Taieb Mehiri	
	Code postal et ville	2070	LA MARSA (Tunisie)
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 16 octobre 2002 DESAMX Anne CPI No. 93.3006			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260399

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B4866-VMA	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0107985	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) GENE ASSOCIE A LA VIRULENCE DU PARASITE LEISHMANIA.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT PASTEUR DE TUNIS INSTITUT PASTEUR Représentés par : ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD S.A. 3 rue Chauveau-Lagarde - FR-75008 PARIS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		DELLAGI	
Prénoms		Koussay	
Adresse	Rue	Institut Pasteur de Tunis 13 place Pasteur	
	Code postal et ville	1002	TUNIS (Tunisie)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 16 octobre 2002 DESAIX Anne CPI No. 93.3006			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.
1300 I Street, N.W.
Washington, D.C. 20005

SERIAL NO: 10/733,232

DOCKET NO: 02356.0087